

Die Oligomerisierung des Nukleoproteins und ihre Bedeutung für den Replikationszyklus der Arenaviren



Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Frank Lennartz
aus Essen

Marburg/Lahn, 2012

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juni 2008 bis Februar 2012 im Institut für Virologie, Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker, Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Garten durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180)
als Dissertation angenommen am : 28.05.2012

Erstgutachter : Prof. Dr. Klaus Lingelbach
Zweitgutachter : Prof. Dr. Wolfgang Garten

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission :

Prof. Dr. Erhard Bremer
Prof. Dr. Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2012

Für meine Eltern

**Sometimes, the best answer is
a more interesting question.**

- Terry Pratchett

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Verbreitung und Phylogenie der <i>Arenaviridae</i>	1
1.2 Das Lassavirus	3
1.2.1 Epidemiologie und Übertragung	3
1.2.2 Pathogenese und Behandlung der Lassavirusinfektion	4
1.3 Molekularbiologie der Arenaviren	5
1.3.1 Aufbau und Struktur der <i>Arenaviridae</i>	5
1.3.2 Proteine der Arenaviren und ihre Funktionen	7
1.3.3 Replikation der Arenaviren	11
1.4 Das Nukleoprotein der Arenaviren	15
1.4.1 Biologische Funktionen des Nukleoproteins	15
1.4.2 Struktur des Nukleoproteins	18
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	20

2. Material

2.1 Chemikalien	22
2.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.3 Kommerziell erhältliche Reaktionsansätze (Kits)	24
2.4 Geräte	24
2.5 Größen – und Mengenstandards	25
2.6 Enzyme	25
2.7 Oligonukleotide für PCR (Primer)	25
2.8 Vektoren	28
2.9 rekombinante Plasmide	28
2.10 Antikörper	29
2.10.1 Primärantikörper	29
2.10.2 Sekundärantikörper	30
2.11 Bakterien	30
2.12 Eukaryotische Zellen	31
2.13. Medien und Puffer	31
2.13.1 Puffer	31
2.13.2 Wachstumsmedien für Bakterien	33
2.13.2 Wachstumsmedien und Zusätze für eukaryotische Zellen	33

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden	34
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.1.2 Reaktionansätze für die PCR	34
3.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	35
3.1.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	35
3.1.5 Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA	35
3.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase	36
3.1.7 Ligation von PCR – Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	36
3.1.8 Plasmidpräparation in kleinem Maßstab (Mini-Präp)	37
3.1.9 Plasmidpräparation in großem Maßstab (Maxi-Präp)	37
3.1.10 Herstellung von Deletionsmutanten	37
3.1.11 Punktmutagenese mittels Quickchange	38
3.2 - mikrobiologische Methoden	40
3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	40
3.2.2 Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i>	40
3.2.3 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	40
3.2.4 Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i>	40
3.3 – Zellkulturtechniken	41
3.3.1 Kultur von eukaryotischen Zellen	41
3.3.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels TurboFect™ und Lipofectamine™ 2000	41
3.4 – proteinbiochemische Methoden	42
3.4.1 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.4.2 Elektrotransfer auf Nitrocellulosemembranen (Western Blot)	43
3.4.3 Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen	43
3.4.4 Nachweis von Proteinen durch Coomassie-Färbung	43
3.4.5 Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation	44
3.4.6 Indirekte Immunfluoreszenz	44
3.4.7 Ko-Immunpräzipitation	45
3.4.8 Herstellung und Reinigung virusähnlicher Partikel	45
3.4.9 Protease – Protektionsversuch	46
3.4.10 Expression von MBP-Fusionsproteinen in <i>Escherichia coli</i>	46
3.4.11 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie	47
3.4.12 Spaltung von MBP-Fusionsproteinen	48
3.4.13 Gelfiltrationschromatographie mittels ÄKTA-FPLC	48
3.4.14 Vorbereitung von Proben für Elektronenmikroskopie	49

3.4.15 Interferon β - Induktionsnachweis	49
3.4.16 Messungen mit dem Lassavirus Replicon-System	50

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von prokaryotisch und eukaryotisch exprimiertem Nukleoprotein	51
4.1.1 Expression des Lassavirus Nukleoproteins in <i>Escherichia coli</i>	51
4.1.2 Oligomerisierung des Nukleoproteins	55
4.1.3 Ultrastruktur des trimeren NP-Komplexes	58
4.1.4 Charakterisierung spezifischer Spaltfragmente des Nukleoproteins	59
4.2 Charakterisierung der NP – NP – Interaktion	62
4.2.1 Interaktion von N-terminalen NP-Deletionsmutanten mit wildtypischem NP	62
4.2.2 Interaktion von C-terminalen NP-Deletionsmutanten mit wildtypischem NP	64
4.2.3 Eingrenzung und Charakterisierung der NP-NP-Interaktionsdomäne	66
4.3 Bedeutung der NP-Oligomerisierung für die biologische Funktion des Nukleoproteins	74
4.3.1 Funktionalität der NP-Alanin-Substitutionsmutanten und der Mutante NP Δ 1-86 bei der Replikation des Lassavirus Minigenoms	74
4.3.2 Einbau von NP Alanin-Substitutionsmutanten und der Mutante NP Δ 1-86 in Z-induzierte VLPs	77
4.3.3 Inhibition der zellulären Interferon-Antwort durch Alanin-Substitutionsmutanten und die Mutante NP Δ 1-86	79
4.4 Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und dem Matrixprotein Z	82
4.4.1 Interaktion von NP-Deletionsmutanten mit wildtypischem Z-Protein	82
4.4.2 Eingrenzung der für die NP-Z-Interaktion kritischen Aminosäurebereiche innerhalb des NP	86
4.4.3 Interaktion zwischen prokaryotisch exprimiertem Nukleoprotein und Matrixprotein	91
4.5 Konservierung der NP-NP und NP-Z-Interaktion innerhalb der <i>Arenaviridae</i>	93
4.5.1 Heterotypische Interaktionen zwischen Nukleoproteinen verschiedener Arenaviren	93
4.5.2 Heterotypische Interaktionen zwischen Nukleoproteinen und Matrixproteinen verschiedener Arenaviren	97

5. Diskussion

5.1 Charakterisierung von prokaryotisch und eukaryotisch exprimiertem Nukleoprotein	101
5.2 Charakterisierung der NP-NP-Interaktion	106
5.3 Bedeutung der NP-Oligomerisierung für die biologische Funktion des Nukleoproteins	111
5.3.1 Bedeutung der NP-Trimerisierung für die Replikation und Transkription des viralen Genoms.....	111
5.3.2 Bedeutung der NP-Trimerisierung für die Interaktion mit dem Matrixprotein Z	113
5.3.3 Bedeutung der NP-Trimerisierung für die Funktionalität des NP als Antagonist der Interferon I – Antwort	113
5.4 Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und dem Matrixprotein Z	116
5.5 Konservierung der NP-NP und NP-Z-Interaktion innerhalb der <i>Arenaviridae</i>	119
5.6 Schlussbetrachtung	123

6 - Zusammenfassung	125
----------------------------	-----

7 - Summary	126
--------------------	-----

8 - Literatur	127
----------------------	-----

Anhänge

Anhang A1: Proteinbank-Zugriffsnummern für Arenavirus-Nukleoproteine	VI
Anhang A2: Sekundärstrukturvorhersage für das Nukleoprotein des Lassavirus	VII
Anhang A3: Multipler Sequenzvergleich des NP der <i>Arenaviridae</i>	VIII
Anhang A4: Vorhersage über <i>coiled-coils</i> im Nukleoprotein des Lassavirus	XII
Anhang A5: Übersicht über die für das Replicon-System verwendeten Konstrukte	XIII
Anhang A6: Abkürzungsverzeichnis	XIV
Anhang A7: Abbildungsverzeichnis	XVI
Veröffentlichungen	XVIII
Lebenslauf	XX
Danksagung	XXII

1. Einleitung

1.1 Verbreitung und Phylogenie der *Arenaviridae*

Die Familie der *Arenaviridae* umfasst nach derzeitigem Kenntnisstand 34 Spezies, wobei insbesondere in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Vertreter dieser Virusgruppe identifiziert werden konnten (Briese et al., 2009; Coulibaly-N'Golo et al., 2011; Lecompte et al., 2007). Nach ihrem geographischen Vorkommen werden die Arenaviren in Altwelt- und Neuweltarenaviren eingeteilt. Erstere finden sich in Afrika, während die Neuweltarenaviren in Nord- und Südamerika anzutreffen sind. Eine Ausnahme bildet das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV), das weltweit vorkommt.

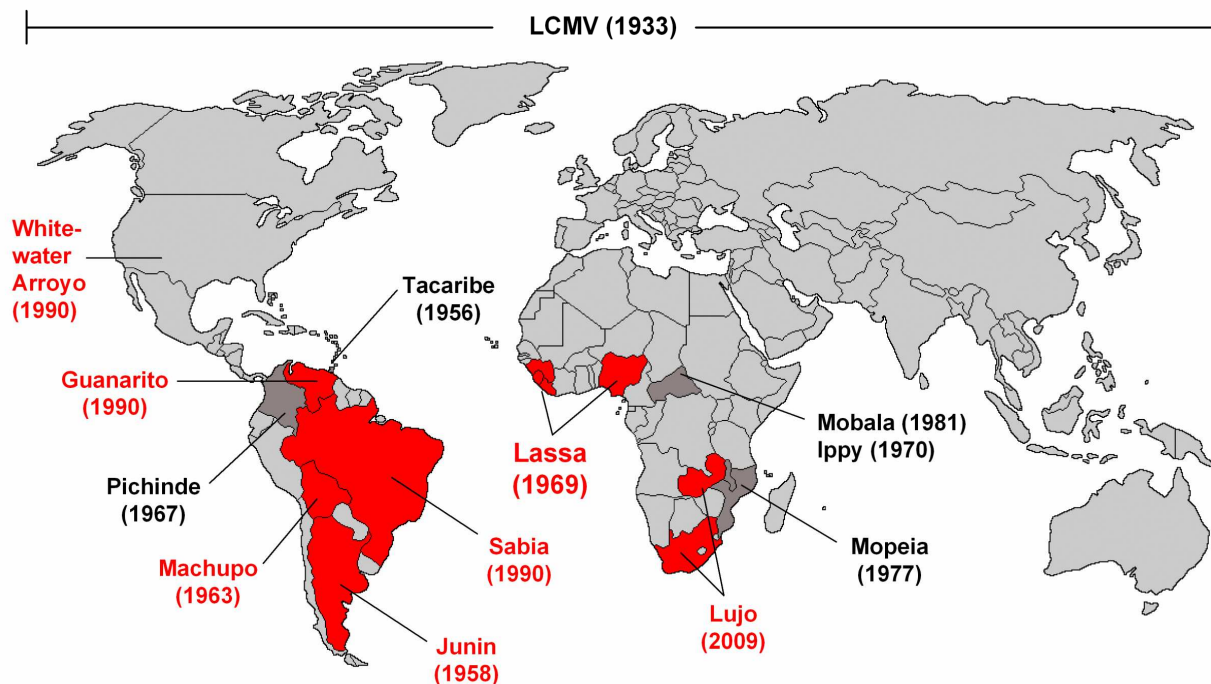


Abb. 1: Geographische Verbreitung der Arenaviren

Die Altweltarenaviren sind in Afrika verbreitet, die Neuweltarenaviren finden sich in Nord- und Südamerika. Das LCMV ist weltweit verbreitet. Humanpathogene Vertreter sind rot unterlegt. Jahreszahlen in Klammern geben das Jahr der Erstbeschreibung an.

In beiden Untergruppen gibt es humanpathogene Vertreter, die im Menschen schwere hämorrhagische Fieber auslösen können. Bei den Neuweltarenaviren sind dies das Junin-, Machupo-, Guanarito-, Sabia- sowie das Whitewater-Arroyovirus (vgl. Abb. 1). Innerhalb der Altweltarenaviren sind humanpathogene Vertreter das erst kürzlich entdeckte Lujovirus (Briese et al., 2009) sowie das Lassavirus (Buckley and Casals, 1970), um das es

in dieser Arbeit gehen soll. Daneben ist auch das LCMV in seltenen Fällen in der Lage, den Menschen zu infizieren und kann dort eine schwere Meningitis auslösen (Folk et al., 2011; Peters, 2006).

Die Einteilung der Arenaviren in Neu- und Altweltarenaviren spiegelt sich auch in ihren serologischen Eigenschaften wieder. Nach den antigenischen Eigenschaften eingeteilt lassen sich innerhalb der Arenaviren der Tacaribe-Serokomplex, der neben dem Tacaribevirus die Neuweltarenaviren beinhaltet, sowie der Lassa-Lymphozytäre Choriomeningitis - Serokomplex ausmachen, der die Altweltarenaviren umfasst (Casals et al., 1975; Clegg et al., 1991). Die genetische Einteilung der Arenaviren, die auf Basis des Vergleiches der Nukleotidsequenzen des Glykoproteins und des Nukleoproteins erfolgt (Bowen et al., 1997), zeigt zudem, dass die Altweltarenaviren eine monophyletische Gruppe bilden, während sich die Neuweltarenaviren in drei Kladen A, B und C einordnen lassen (Abb. 2).

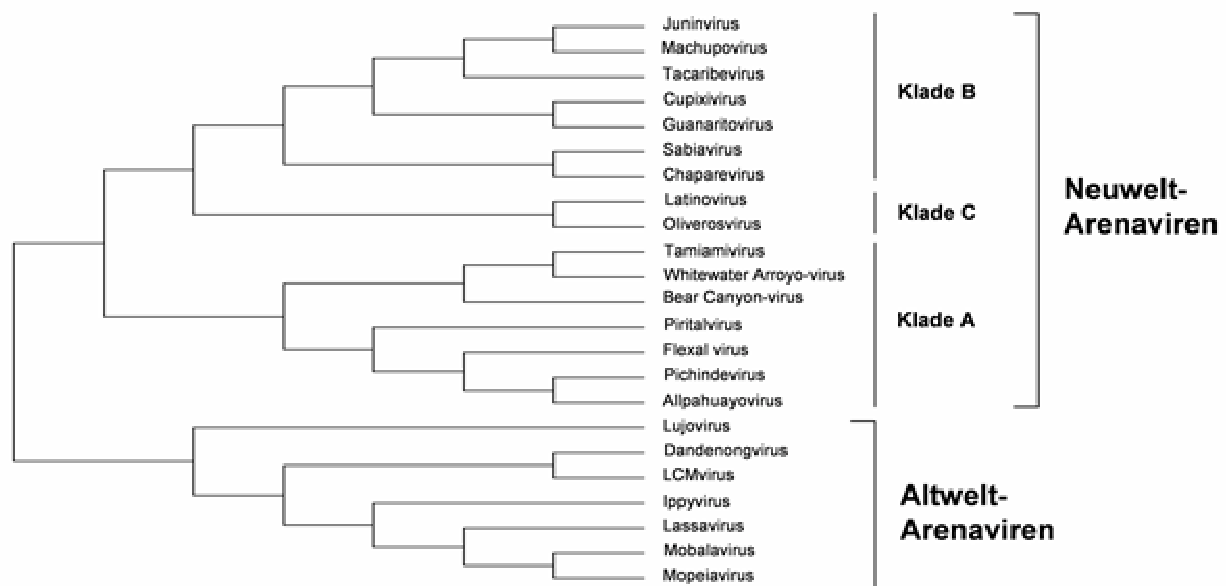


Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum einiger Vertreter der Familie Arenaviridae

Der Stammbaum wurde mit Hilfe der Programme ClustalW¹ und MEGA (Tamura et al., 2011) auf Basis der Aminosäuresequenzen des NP der einzelnen Viren erstellt. Für den Sequenzvergleich mit ClustalW wurden Standardeinstellungen verwendet. Die Distanzen wurden mit der in MEGA 5.05 implementierten Neighbor-joining-Methode errechnet. Die zugehörigen Proteinbank-Zugriffsnummern finden sich im Anhang A1.

Die Unterteilung der Neuweltarenaviren in drei Kladen spiegelt sich auch in ihrer Biologie wieder. Als zellulärer Rezeptor der Altweltarenaviren sowie der Neuweltarenaviren

1 : www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw/

Oliveros und Latino, die der Klade C zugeordnet sind, wurde α -Dystroglycan identifiziert (Cao et al., 1998; Spiropoulou et al., 2002), der Rezeptor der Neuweltarenaviren der Klade B ist hingegen Transferrin 1 (Radoshitzky et al., 2007). Interessanterweise finden sich alle humanpathogenen Vertreter der Neuweltarenaviren in der Klade B wieder. Allerdings gibt es auch Unterschiede innerhalb der einzelnen Kladen. Das Tacaribevirus, das der Klade B innerhalb der Neuweltarenaviren zugeordnet wird, ist das einzige Arenavirus, das nicht in Nagern persistiert, sondern aus Fledermäusen der Gattung *Artibeus spp.* isoliert wurde (Price, 1978). Die Arenaviren bilden also eine sehr diverse Familie, innerhalb derer es hinsichtlich ihrer Biologie zwar viele Gemeinsamkeiten, jedoch auch signifikante Unterschiede gibt. Der Krankheitsverlauf bei einer Infektion mit humanpathogenen Arenaviren soll im Folgenden am Beispiel des Lassavirus beschrieben werden, das Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war.

1.2 Das Lassavirus

Das Lassavirus wurde erstmals im Jahr 1969 isoliert (Buckley and Casals, 1970). Es ist unter den humanpathogenen Arenaviren dasjenige mit der größten Prävalenz: jährlich infizieren sich in den betroffenen Gebieten bis zu 300.000 Menschen wobei die Mortalitätsrate unter den hospitalisierten Fällen bei ca. 15 % liegt (McCormick and Fisher-Hoch, 2002). Da allerdings nur ein geringer Teil der Infizierten in Krankenhäuser eingeliefert wird, könnte die tatsächliche Anzahl an Individuen, die einer Lassavirus-Infektion erliegen deutlich höher sein.

1.2.1 Epidemiologie und Übertragung

Das natürliche Reservoir des Lassavirus ist die Natal-Vielzitzenmaus *Mastomys natalensis* (Lecompte et al., 2006). Insbesondere in den Endemiegebieten Sierra Leone, Guinea, Liberia und Nigeria ist eine großer Prozentsatz der Nager mit dem Virus infiziert, dementsprechend kommt es dort häufig zur Übertragung auf den Menschen. Die chronisch infizierten Mäuse scheiden das Virus lebenslang über den Urin und den Speichel aus. Als Infektionsquellen für den Menschen konnten kontaminierte Nahrung sowie urinhaltige Aerosole ausgemacht werden. Insbesondere Menschen, die in der Landwirtschaft beschäftigt sind, kommen in engen Kontakt mit den infizierten Nagern. Die Infektionshäufigkeit hängt auch mit ökologischen Faktoren zusammen, wie beispielsweise die stark gehäufte Infektionsrate während der Regenzeit in den betroffenen Gebieten zeigt (Fichet-Calvet et al., 2007). Weitere Infektionsquellen mit untergeordneter Relevanz sind der Verzehr der infizierten Nager (Ter Meulen et al., 1996) und die nosokomiale Infektion, die

besonders durch die oftmals schlechten hygienischen Bedingungen in vielen westafrikanischen Krankenhäusern begünstigt wird (Fisher-Hoch et al., 1995).

1.2.2 Pathogenese und Behandlung der Lassavirusinfektion

Das Lassavirus kann im Menschen das Lassafieber auslösen. Bei einer Infektion mit dem Virus kommt es nach einer Inkubationszeit von 1 bis 24 Tagen zu den ersten Symptomen, die denen einer Grippe ähneln. Einhergehend mit einem Temperaturanstieg auf ca. 39°C treten als begleitende Symptome oft Husten, Kopf- und Abdominalschmerzen sowie Übelkeit, Durchfall und eine generelle Schwächung auf (McCormick et al., 1987). Ca. zwei Drittel der Patienten überstehen die Infektion ohne Komplikationen, wobei bei ca. 29% dieser Patientengruppe als Spätfolge ein temporärer oder permanenter Hörverlust auftritt, dessen Ursachen noch nicht geklärt sind (Cummins et al., 1990).

Bei einem Drittel der hospitalisierten Patienten kommt es im Zuge einer Lassavirus-Infektion hingegen zu schweren Hämorrhagien, die in den inneren Organen wie der Niere, Lunge, dem Magen oder dem Gehirn auftreten können. Diese Blutungen deuten auf einen fulminanten Krankheitsausbruch mit einer schlechten Prognose hin. Bedingt durch die erhöhte vaskuläre Permeabilität kommt es zu Pleuraerguss, Ödemen, Schock und schließlich zum Tod durch multiples Organversagen. Schwangere Frauen stellen eine Hochrisikogruppe dar; die Letalität liegt in diesen Fällen bei ca. 80% und es kommt häufig zum Abort des Kindes (Price et al., 1988).

Im histopathologischen Verlauf der Krankheit sind Endothelzellen und Makrophagen vermutlich die ersten Zielzellen der Virusinfektion (Lukashevich et al., 1999). Insbesondere über Letztere könnte das Virus nahezu im gesamten Körper verbreitet werden, da es sich in zahlreichen Organen und Endothelien nachweisen lässt. Die Replikation des Virus in vaskulären Endothelien und verschiedenen anderen Zelltypen verläuft jedoch ohne ausgeprägten zytopathischen Effekt; weiterhin führt die Infektion von Makrophagen und dendritischen Zellen nicht zu deren Aktivierung (Lukashevich et al., 1999), so dass die Gründe für die erhöhte Permeabilität der vaskulären Endothelien noch ungeklärt sind.

Eine zugelassene Schutzimpfung gegen eine Infektion mit dem Lassavirus gibt es trotz viel versprechender Ansätze wie pseudotypisierte Viren (Geisbert et al., 2005) oder DNA-Vakzinen (Rodriguez-Carreno et al., 2005) noch nicht. Das einzig wirksame Mittel ist das Nukleosid-Analogon Ribavirin, das allerdings nur in den ersten 6-7 Tagen nach Infektion wirksam ist (McCormick et al., 1986). Aufgrund der Ähnlichkeit der ersten Symptome wird eine Lassavirus-Infektion jedoch häufig mit einer beginnenden Malaria oder anderen

fieberartigen Erkrankungen verwechselt und das beginnende Lassafieber daher erst spät oder gar nicht erkannt. Zusätzlich führen die schweren Nebenwirkungen und nicht zuletzt auch die schlechte Verfügbarkeit von Ribavirin in den betroffenen Gebieten dazu, dass eine Therapie mit diesem Mittel nur selten erfolgt. Die Entwicklung einer Impfung oder geeigneter, gut verfügbarer Gegenmittel ist daher unabdinglich, um die Krankheit unter Kontrolle zu bringen. Die Molekularbiologie der Arenaviren, dessen Kenntnis eine Grundvoraussetzung zur Entwicklung solcher Medikamente ist, soll im Folgenden näher beschrieben werden.

1.3 Molekularbiologie der Arenaviren

Strukturell gesehen bilden die Arenaviren eine homogene Gruppe, deren Vertreter sich in Aufbau, Form und Größe der Virionen einander gleichen. Hinsichtlich des Replikationszyklus existieren jedoch einige signifikante Unterschiede, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

1.3.1 Aufbau und Struktur der *Arenaviridae*

Bei den Arenaviren handelt es sich um pleomorphe, lipidumhüllte Partikel, die einen Durchmesser von 50-200 nm aufweisen.

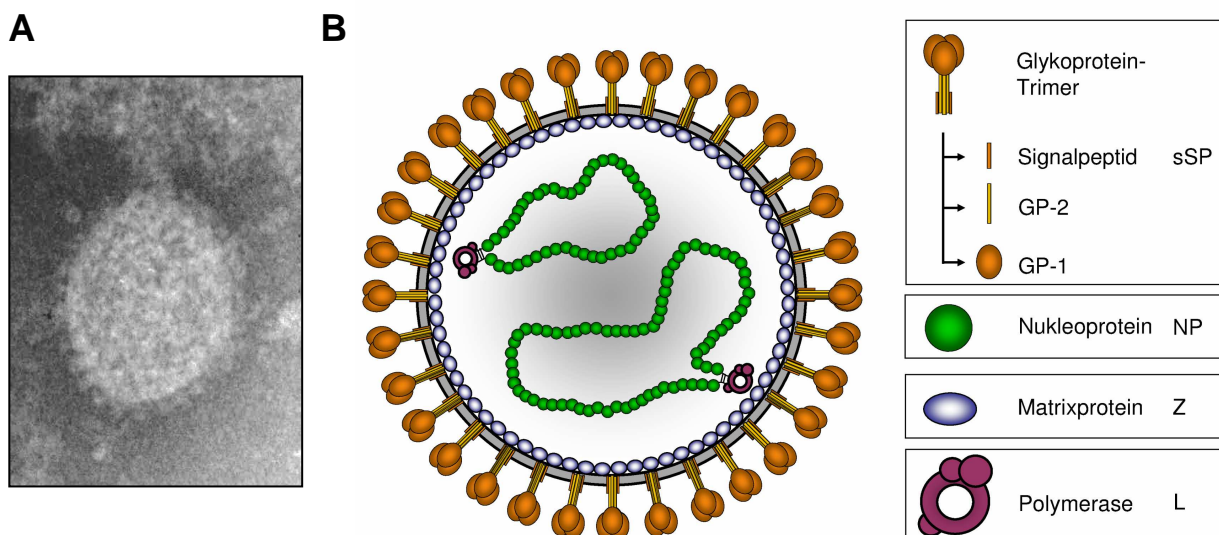


Abb. 3: Ultrastruktur der Arenaviren

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Lassavirus-Partikels, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Larissa Kolesnikova. (B) Schematische Darstellung des Aufbaus eines Arenavirus-Partikels.

1. Einleitung

Die unter dem Elektronenmikroskop sichtbaren, körnigen Einschlüsse geben der Virusfamilie ihren Namen (lat. arenosus = sandig). Früheren Vermutungen nach handelt es sich dabei um Ribosomen. Allerdings ist die Identität der Einschlüsse nicht endgültig geklärt. In die Virusmembran eingelagert sind die trimeren Komplexe des Glykoproteins GP, während die Innenseite der Membran vom Matrixprotein Z ausgekleidet wird (Abb. 3). Im Inneren des Virus befindet sich das virale Genom, das mit dem Nukleoprotein NP sowie der RNA-abhängigen RNA Polymerase L assoziiert ist und mit diesen Proteinen den viralen Ribonukleoproteinkomplex (RNP) bildet.

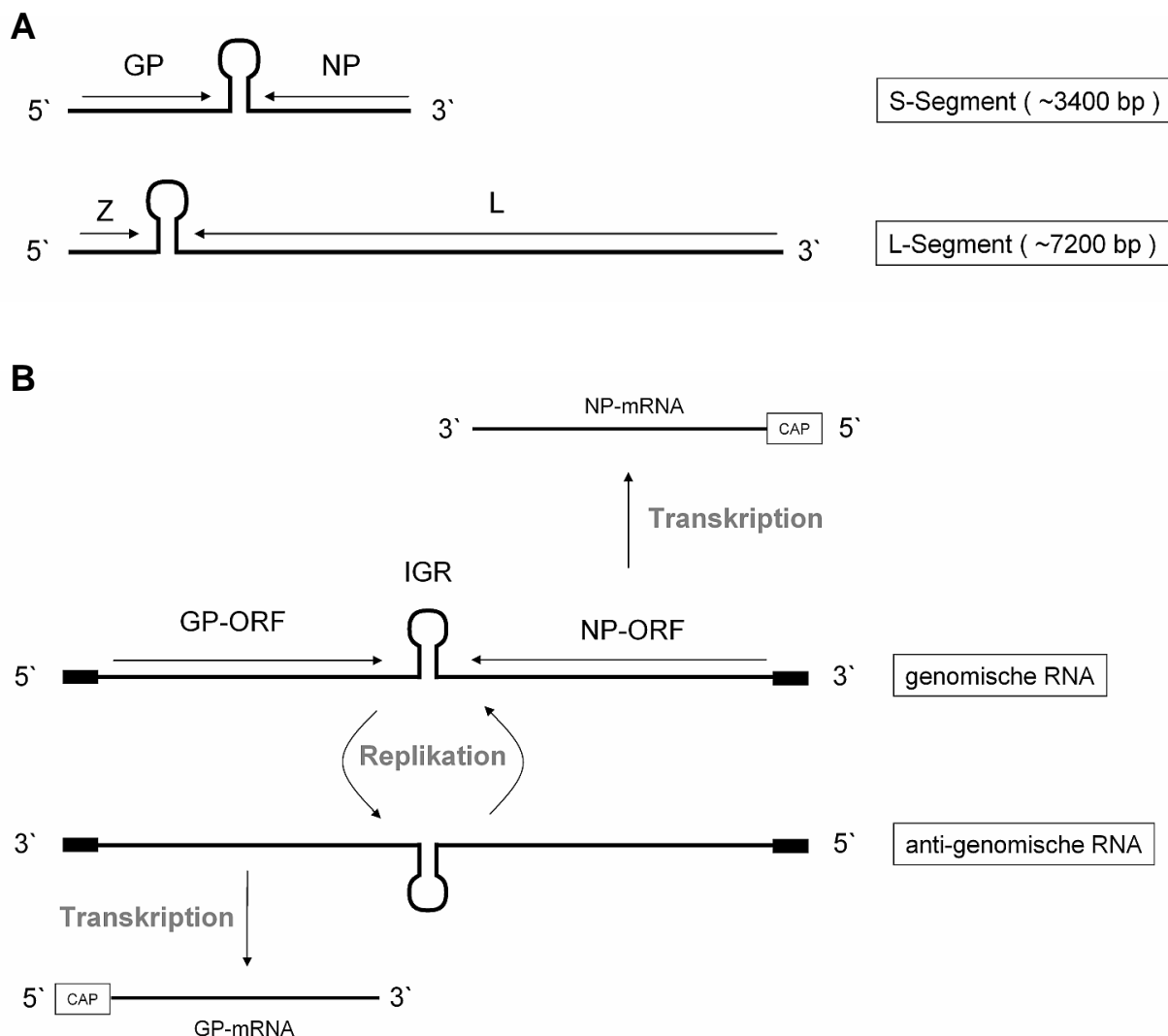


Abb. 4: Organisation und Replikation des Genoms der Arenaviren

(A) Genomische Segmente und die darauf kodierten Proteine. **(B)** Genomreplikation der Arenaviren. Die Replikation des viralen Genoms, sowie die jeweils vom Genom und Antigenom transkribierten mRNA-Spezies sind beispielhaft für das S-Segment gezeigt. Schwarze Balken stehen für nicht-codierende Sequenzregionen an den Termini der RNA-Segmente, die zusammen den Promotor der Arenaviren bilden. ORF = open reading frame, IGR = intergenische Region

Das Genom der Arenaviren ist bisegmentiert und besteht aus dem ca. 3,4 kb großem S-Segment sowie dem ca. 7,2 kb großen L-Segment (Abb. 4). Jedes Segment kodiert für zwei Proteine, wobei das S-Segment für das Nukleoprotein NP und den Vorläufer des Glykoproteins präGPC kodiert, das L-Segment kodiert hingegen für die Gene des Matrixproteins Z und der viralen Polymerase L. Die beiden Gene auf jedem Segment sind durch eine intergenische Region (IGR) getrennt, die eine haarnadelförmige Sekundärstruktur einnimmt und als Terminationssignal bei der mRNA-Transkription fungiert. Weiterhin wird vermutet, dass die IGR eine Rolle bei der Verpackung der vRNP-Komplexe in neue Virenen spielt (Pinschewer et al., 2005). An den beiden Enden der genomischen RNA befinden sich untranslatierte Regionen (UTRs) von ca. 20 Nukleotiden Länge, die zueinander komplementär sind und ähnlich wie bei den genomischen Segmenten der Influenzaviren eine pfannenstielförmige Struktur ausbilden. In der 3' UTR befinden sich dabei Sequenzelemente, die als Promotor für die virale Polymerase fungieren, während die Integrität der Pfannenstielstruktur für die Funktionalität dieses Promotors von Bedeutung ist (Hass et al., 2006; Perez and de la Torre, 2003).

Die Kodierungsrichtung folgt der sog. *Ambisense*-Strategie. Dabei liegen die Gene für das NP und die Polymerase L am 3'-Ende der jeweiligen Segmente und können direkt von der genomischen RNA in mRNA transkribiert werden. Die Gene für das Matrixprotein Z sowie das Glykoprotein GP liegen in entgegengesetzter Richtung und können erst nach Transkription der entsprechenden Antigenome in mRNA umschrieben werden. Diese Kodierungsstrategie hat zur Folge, dass die Translation des Z und des GP erst stattfindet, wenn die intrazelluläre Konzentration an NP und L zur Transkription der Antigenome und anschließender Bildung neuer genomischer RNA-Segmente ausreicht.

1.3.2 Proteine der Arenaviren und ihre Funktionen

Das Z-Protein ist das Matrixprotein der Arenaviren (Perez et al., 2003; Strecker et al., 2003) und ist mit einer Größe von 90-99 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 11 kDa das kleinste der vier Arenavirus-Proteine (Salvato et al., 1992). Es ist über eine N-terminal gelegene Myristylierung membranverankert (Perez et al., 2004; Strecker et al., 2006), kleidet die Virusmembran auf der Innenseite aus und gibt den Virionen so ihre Form (Neuman et al., 2005; Strecker et al., 2003). Sein Name stammt von der Fähigkeit des Z-Proteins, über eine zentral gelegene, ca. 60 Aminosäuren umfassende RING (Really Interesting New Gene) - Domäne zwei Zink-Atome zu koordinieren (Salvato and Shimomaye, 1989). Diese Domäne ist wichtig für die strukturelle Integrität des Z-Proteins (Garcia et al., 2006), spielt aber auch eine Rolle für seine zahlreichen Funktionen (Abb. 5).

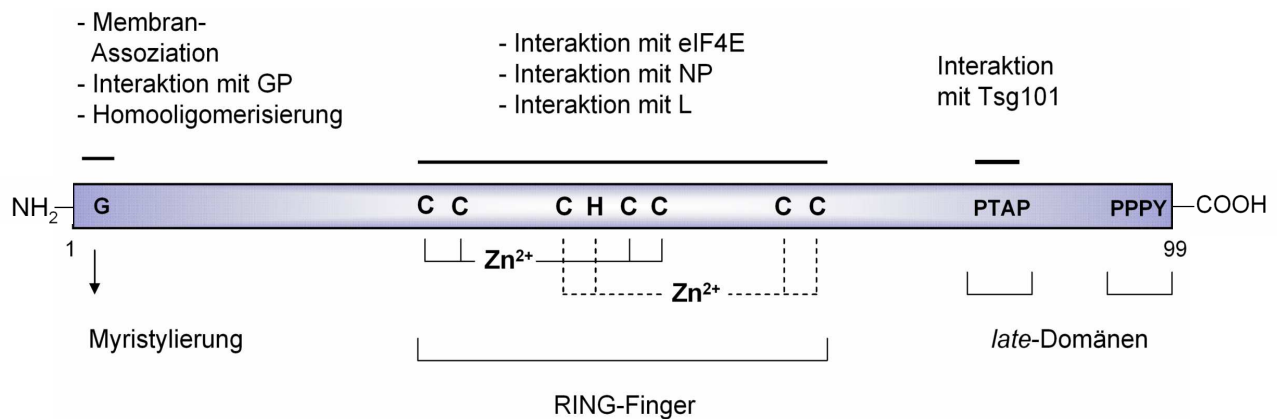


Abb. 5: Strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Z-Proteins

Schematischer Überblick über die Struktur des Z-Proteins. Schwarze Balken markieren funktionelle Bereiche innerhalb des Proteins. Details siehe Text. Modifiziert nach (Günther and Lenz, 2004). eIF4E = eucaryotic translation initiation factor 4E. Tsg101 = tumor susceptibility gene 101. L = virale Polymerase.

Neben seiner Rolle bei der Formgebung der Virionen übernimmt das Z-Protein im Replikationszyklus der Arenaviren weitere zentrale Funktionen, die z.T. über Interaktionen mit viralen Proteinen vermittelt werden. Durch Assoziation mit dem Nukleoprotein NP rekrutiert es die viralen RNP-Komplexe an die Orte der Virusreifung (siehe 1.4.1). Darüber hinaus wurde für das LCMV und das Lassavirus gezeigt, dass die Anwesenheit des Z-Proteins die Transkription und Replikation des viralen Genoms hemmt (Cornu and de la Torre, 2001).

Das Z-Protein besitzt zusätzlich zahlreiche zelluläre Interaktionspartner. Die Matrix-Proteine des Lassavirus sowie des LCMV interagieren mit dem zellulären Faktor Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101) und rekrutieren ihn an die Plasmamembran (Perez and de la Torre, 2003), für das Z-Protein des Mopeiavirus wurde eine Interaktion mit dem Protein Alix/A1P (ALG-2-interacting protein X) nachgewiesen (Shtanko et al., 2011). Tsg101 und Alix/A1P gehören zum zellulären ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) – Komplex, der bei der Bildung von intrazellulären Vesikeln eine große Rolle spielt. Die Interaktion des Z-Proteins mit Komponenten des ESCRT-Komplexes ist die Voraussetzung für die Funktion des Z bei der Viruskospung (Urata et al., 2006). Sie ist zudem ein wichtiger Faktor für die Fähigkeit der Z-Proteine, bei Einzelexpression sog. Virus-ähnliche Partikel (Virus-Like Particles, VLPs) zu bilden, die in Form und Größe reifen Virionen ähneln (Eichler et al., 2004). Die Interaktion von Z mit Tsg101 wird über eine C-terminal gelegene, prolinreiche *late-domäne* vermittelt, wohingegen für die Interaktion des Mopeiavirus Z-Proteins mit Alix/A1P ein zentral gelegenes YxxL-Sequenzmotiv verantwortlich ist. Eine Sonderstellung nimmt das Z-Protein des Tacaribevirus ein, da es keine bekannte *late-domänen* besitzt, trotzdem jedoch in der Lage ist, VLPs zu bilden (Urata et al., 2009).

Zusätzlich zu seiner Rolle bei der Virusreifung ist das Z-Protein in der Lage, in die zelluläre Translation sowie in die zellvermittelte Immunantwort einzugreifen. Die erste dieser beiden Funktionen übt das Z-Protein durch die Wechselwirkung mit dem zellulären Translationsfaktor eIF4E (Eucaryotic translation initiation factor 4E) aus (Campbell Dwyer et al., 2000). Das Z-Protein interagiert dabei über seine RING-Domäne mit eIF4E und setzt dessen Affinität für die 5'-Cap-Strukturen der zellulären mRNAs herab (Volpon et al., 2010). Dadurch wird die Produktion von Proteinen, deren Translation von eIF4E abhängt, spezifisch gehemmt (Campbell Dwyer et al., 2000). Darüber hinaus interagiert das Z-Protein des LCMV und des Lassavirus mit PML (Promyelocyte Leukemia Protein), das es aus dem Kern in das Zytoplasma infizierter Zellen umverteilt (Borden et al., 1998). Diese Interaktion spielt vermutlich eine Rolle bei der Ausbildung einer persistenten Infektion in Zellkultur, die u.a. bei verschiedenen LCMV-Stämmen beobachtet wurde (Djavani et al., 2001). Für die Z-Proteine einiger Neuweltarenaviren der Klade B wurde zudem eine Interaktion mit RIG-I (Retinoic Acid-Inducible Gene I Product) nachgewiesen. RIG-I ist u.a. verantwortlich für die Hochregulation der zellulären Interferon β (IFN β) – Antwort als Reaktion auf eine Virusinfektion, und die Interaktion von Z mit RIG-I trägt dazu bei, die Induktion dieser zellulären Immunantwort zu inhibieren (Fan et al., 2010).

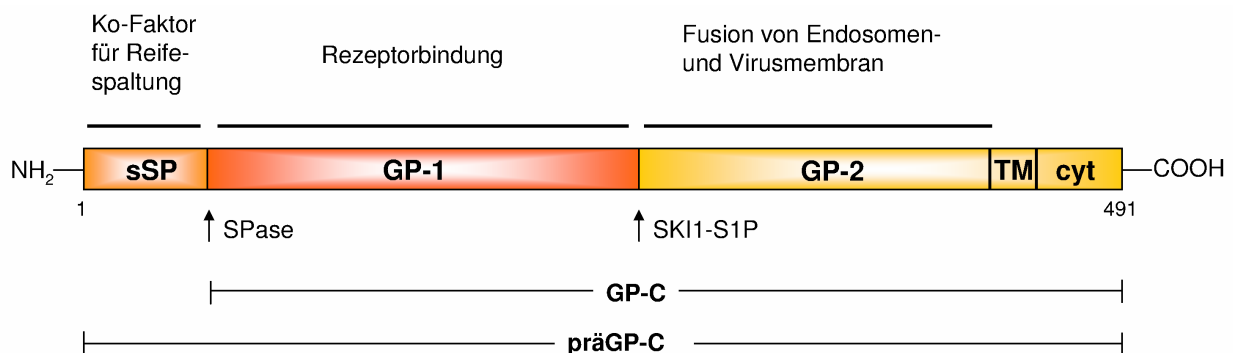


Abb. 6: Strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Glykoproteins

Schematischer Überblick über die Struktur des Glykoproteins. Schwarze Balken markieren funktionelle Bereiche innerhalb des Proteins. Pfeile deuten Spaltstellen der Signalpeptidase (SPase) und der Protease SKI-1/S1P an. sSP = stabiles Signalpeptid. GP-1 = rezeptorbindende Untereinheit des GP. GP-2 = membrangebundene Untereinheit des GP. TM = Transmembrandomäne. Cyt = zytosolische Domäne.

Das Glykoprotein GP der Arenaviren hat eine Größe von ca. 489 Aminosäuren (Abb. 6) bei einem Molekulargewicht von ca. 72 kDa und ist als homotrimerer Komplex in die virale Membran eingelagert (Schlie et al., 2010b). Es ist ein Typ I – Membranprotein und wird als Vorläufer präGP-C in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert. Dort wird der Vorläufer durch die zelluläre Signalpeptidase in den GP-C - Anteil sowie das stabile

Signalpeptid sSP gespalten. Letzteres stellt eine Besonderheit der Arenaviren dar, da es mit 58 Aminosäuren (AS) eine ungewöhnliche Länge aufweist (Eichler et al., 2003b). Zudem bleibt es bei dem weiteren Transport an die Zelloberfläche mit dem Glykoprotein assoziiert und wird zusammen mit diesem in Virionen eingebaut (Froeschke et al., 2003). Ein derartiges stabiles Signalpeptid wurde außerhalb der Arenaviren bisher nur bei den Foamyviren gefunden, die zu den Retroviren gehören (Lindemann et al., 2001). Nach seiner Synthese wird das GP-C über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert. Während dieses Transportes wird das Glykoprotein stark verzuckert (Eichler et al., 2006) und im trans Golgi – Netzwerk durch die zelluläre Subtilase SKI-1/S1P (Subtilisin Kexin Isozyme-1/Site-1 Protease) in seine Untereinheiten GP-1 und GP-2 gespalten (Lenz et al., 2001). Das sSP wurde als essentieller, *trans*-aktivierender Faktor für diese Reifespaltung identifiziert, wobei noch unklar ist, wie das sSP diese Funktion ausübt. Der Austausch des sSP durch ein anderes Signalpeptid verhindert allerdings die Prozessierung des GP-C (Eichler et al., 2003a). Über die Spaltung in die Untereinheiten GP-1 und GP-2 hinaus ist die Prozessierung des GP-C eine Grundvoraussetzung für die korrekte Zusammenlagerung zu trimeren Glykoprotein-Komplexen (Schlie et al., 2010b). Bei diesem Prozess spielt auch die zytoplasmatische Domäne des GP-C eine entscheidende Rolle (Schlie et al., 2010c). Die beiden Untereinheiten GP-1 und GP-2 sind im gespaltenen Glykoprotein durch nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander assoziiert. GP-1 vermittelt die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor (Borrow and Oldstone, 1994), während GP-2 den Glykoproteinkomplex über eine Transmembrandomäne in der viralen Membran verankert und für die Fusion von viraler und endsomaler Membran verantwortlich ist (Gallaher et al., 2001). Wie auch das Z-Protein ist das GP in der Lage, virusähnliche Partikel zu bilden (Schlie et al., 2010a). Die Mechanismen, die dieser Fähigkeit zugrunde liegen, sind jedoch noch unbekannt.

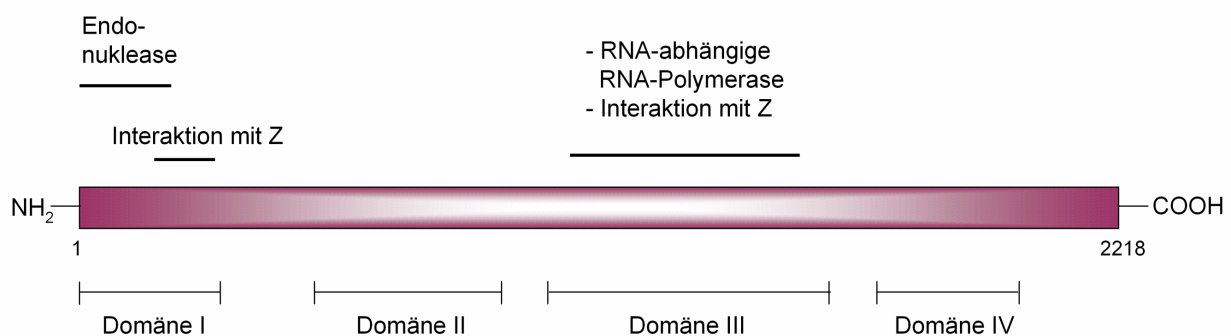


Abb. 7: Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Polymerase

schematischer Überblick über die Struktur der Polymerase. Schwarze Balken markieren funktionelle Bereiche innerhalb des Proteins. Details siehe Text. Domänen I-IV = mittels biochemischer Analysen ermittelte, strukturelle Domänen der Polymerase (Brunotte et al., 2011b; Kranzusch et al., 2010).

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase L ist im Virus mit den RNP-Komplexen assoziiert und mit einem Molekulargewicht von 200 kDa und einer Länge von ca. 2218 Aminosäuren das größte der Arenavirus-Proteine (Abb. 7). Ultrastrukturelle und biochemische Untersuchungen ergaben, dass die Polymerase aus mindestens drei Untereinheiten besteht: einer ringförmigen, C-terminal gelegenen Core-Untereinheit, die die eigentliche Polymerase darstellt, sowie mehreren länglichen Untereinheiten, deren Funktionen noch nicht näher charakterisiert sind (Brunotte et al., 2011b; Kranzusch et al., 2010). Dieser Aufbau erinnert an die Ultrastruktur der Polymerase anderer Negativ-Strang RNA-Viren mit segmentiertem Genom und deutet auf ein gemeinsames Funktionsprinzip hin (Reguera et al., 2010). Das L-Protein interagiert mit dem Nukleoprotein sowie mit dem Matrixprotein Z (Jacamo et al., 2003; Kerber et al., 2011). Zusammen mit dem NP stellt es die minimalen Faktoren zur Replikation und Transkription des viralen Genoms dar (Hass et al., 2004; Lee et al., 2000). Die Interaktion mit dem Z-Protein hingegen ist vermutlich für die Z-vermittelte Inhibition dieser Prozesse verantwortlich (Lopez et al., 2001). Die Polymerase bildet Homo-Oligomere, wobei die Funktion dieser Selbst-Interaktion noch nicht näher geklärt ist (Sanchez and de la Torre, 2005). Neben seiner Funktion als Polymerase wurde eine N-terminal gelegene Endonuklease innerhalb des L-Proteins identifiziert. Diese dient vermutlich dazu, die Cap-Struktur zellulärer mRNAs zu abzuschneiden (sog. *cap-snatching*) um diese dann als Primer zur Produktion viraler mRNAs zu verwenden (Morin et al., 2010).

Auf das Nukleoprotein, das in dieser Arbeit näher charakterisiert wurde, wird in einem separaten Abschnitt ausführlich eingegangen (siehe 1.4)

1.3.3 Replikation der Arenaviren

Der Replikationszyklus der Arenaviren beginnt mit der Bindung an den zellulären Rezeptor, die durch die Untereinheit GP-1 des Glykoproteins vermittelt wird. Für die Altweltarenaviren und die Neuweltarenaviren der Klade C ist dies das in zahlreichen Geweben exprimierte Zelloberflächenprotein α -Dystroglycan (Cao et al., 1998; Spiropoulou et al., 2002), welches die Zellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix verknüpft. Da dendritische Zellen im Vergleich zu anderen Zellen des Immunsystems besonders große Mengen an α -Dystroglycan exprimieren, gehören sie vermutlich zu den primären Zielzellen einer Arenavirus-Infektion (Oldstone and Campbell, 2011). Während der Rezeptor für die Neuweltarenaviren der Klade A noch unbekannt ist, wurde als Rezeptor für die Neuweltarenaviren der Klade B der ubiquitär exprimierte humane Transferrin 1 – Rezeptor (hTfR1) bzw. dessen Orthologe in den jeweiligen Wirtsspezies identifiziert (Abraham et al., 2009; Radoshitzky et al., 2007).

Der zweite Schritt im Replikationszyklus der Arenaviren ist die Aufnahme der Virionen in ihre Zielzellen. Zwar gelangen alle Arenaviren mittels rezeptorvermittelter Endozytose in das Innere der Zellen; die Details dieser Aufnahme zeigen jedoch auch hier signifikante Unterschiede zwischen Neu- und Altweltarenaviren. Das Altweltarenavirus LCMV wird über glatte Vesikel in die Zelle aufgenommen (Borrow and Oldstone, 1994). Für das LCMV und das Lassavirus wurde gezeigt, dass es sich bei diesem Prozess weder um Makropinocytose, noch um eine Clathrin- oder Caveolin-vermittelte Endozytose handelt (Quirin et al., 2008; Rojek et al., 2008a; Rojek et al., 2008b). Die Aufnahme des LCMV ist zudem abhängig von Cholesterin (Rojek et al., 2008a). Im Gegensatz dazu weisen Studien am Juninvirus, das zu den Neuweltarenaviren gehört, darauf hin, dass diese Viren mittels Clathrin-vermittelter Endozytose aufgenommen werden (Martinez et al., 2007). Als Grund für diese Unterschiede wurde der Gebrauch unterschiedlicher Rezeptoren bei den Altweltarenaviren und den Neuweltarenaviren der Klade B vermutet (s.o.). Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Aufnahme der Altweltarenaviren einem Weg folgt, der mit der Endozytose und Degradation ihres zellulären Rezeptors α -Dystroglycan verknüpft ist (Pasqual et al., 2011). Sowohl im Falle der Altwelt- als auch der Neuweltarenaviren werden die endozytierten Virionen zu den späten Endosomen transportiert. Für das Juninvirus führt dieser Weg vermutlich über die frühen Endosomen (Rojek et al., 2008b), der Transport von LASV und LCMV zu den späten Endosomen führt hingegen über die so genannten multivesikulären Körperchen (multivesicular bodies, MVB), von denen aus die Virionen unter Beteiligung der zellulären ESCRT-Maschinerie in späte Endosomen sortiert werden (Pasqual et al., 2011).

Im dritten Schritt während der Arenavirus-Replikation kommt es zur Fusion von Virus- und Endosomenmembran und zur Freisetzung der RNP-Komplexe in das Zytoplasma der infizierten Zellen. Dieser Vorgang erfolgt nach Ansäuerung des Endosoms und findet für das Lassavirus bei einem ungewöhnlich niedrigem pH von $< 5,0$ statt (Klewitz et al., 2007), während für das Juninvirus eine Fusion bei einem pH von 5,0 beschrieben wurde (York et al., 2004). Durch die pH-Absenkung dissoziiert die rezeptorbindende Untereinheit GP-1 vom Glykoproteinkomplex (Di Simone and Buchmeier, 1995) und legt dabei ein zweigeteiltes, hydrophobes Fusionspeptid am N-Terminus der membranverankerten Untereinheit GP-2 frei. Dieses inseriert in die Endosomenmembran und bringt diese durch eine weitere, pH-induzierte Konformationsänderung des GP-2 in räumliche Nähe zur Virusmembran, wodurch es zur Verschmelzung beider Membranen und der Ausbildung der sog. Fusionspore kommt (Weissenhorn et al., 1999). Diese weitet sich im Folgenden aus und ermöglicht es dem aus NP, L und der viralen RNA bestehenden RNP, ins Zytoplasma der Zelle zu gelangen.

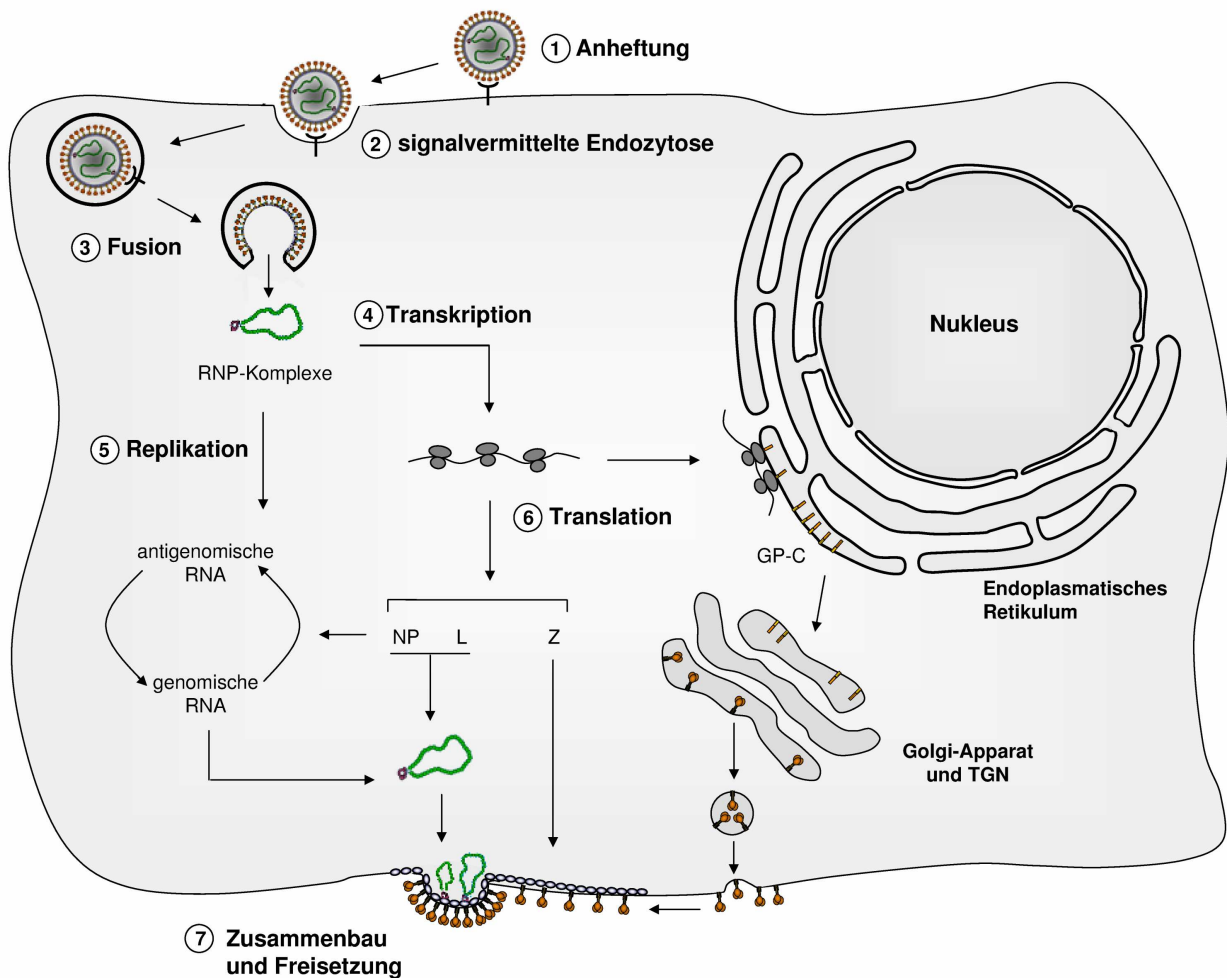


Abb. 8: Schematischer Überblick über den Replikationszyklus der Arenaviren

Die Schritte des Replikationszyklus sind im Einzelnen (1) Glykoprotein-vermittelte Bindung an den zellulären Rezeptor; (2) endozytotische Aufnahme in die Zelle, (3) GP-2 vermittelte Fusion von Virus- und Endosom-Membran sowie Freisetzung der RNP-Komplexe in das Zytoplasma; (4) Transkription der Genome und Antigenome in mRNA; (5) Replikation des viralen Genoms in antigenomische RNA und zurück in genomische RNA; (6) Translation von NP, Z und L an freien Ribosomen. Der Glykoproteinvorläufer GP-C wird ko-translational in das ER inseriert und anschließend über den Golgi-Apparat, wo die Reifespaltung stattfindet, an die Zelloberfläche transportiert; (7) Zusammenlagerung von NP, L und genomischer RNA zu RNP-Komplexen sowie anschließender, Z-vermittelter Einbau in abknospende, Glykoprotein-haltige Virionen. TGN = Trans-Golgi-Netzwerk. RNP-Komplexe = Ribonukleoprotein-Komplexe.

Ausgehend von diesen RNPs findet nun die Transkription statt. Dabei entstehen Transkripte, die an der intergenischen Region terminieren und deren 3' Ende nicht polyadenyliert ist (Iapalucci et al., 1991). Die Transkripte weisen an ihrem 5' Ende eine Cap-Struktur auf, die ursprünglich von zellulären mRNAs stammt und vermutlich durch die virale Polymerase mittels *cap-snatching* zur Verfügung gestellt wird (Morin et al., 2010; Raju et al., 1990). Es kommt zur Produktion der antigenomischen RNA, die zur Transkription der mRNAs für das

Glykoprotein und das Z-Protein benötigt wird. Diese Antigenome sind im Gegensatz zu den subgenomischen mRNAs durch das NP enkapsidiert und weisen keine Cap-Struktur auf (Leung et al., 1977; Raju et al., 1990). Damit diese Antigenome entstehen können, darf die durch die virale Polymerase vermittelte Transkription nicht an der intergenischen Region terminieren, sondern muss das gesamte Genom umfassen. Wie dies zustande kommt, ist noch ungeklärt, es existieren jedoch unterschiedliche Erklärungsansätze, bei denen dem Nukleoprotein jeweils eine zentrale Rolle hinsichtlich der Produktion genomischer und antigenomischer RNA zugeschrieben wird (siehe 1.4.1). Neben den mRNAs für das GP und das Z-Protein wird ausgehend von der antigenomischen mRNA wieder genomische RNA produziert, welche zusammen mit dem NP und der Polymerase RNP-Komplexe bildet, die dann in neu entstehende Virionen verpackt werden können.

Die Synthese der Polymerase L, des Nukleoproteins NP und des Matrixproteins Z findet im Zytoplasma der infizierten Zelle statt. Während NP und L neue RNP-Komplexe bilden, wird das Glykoprotein ko-translational in das endoplasmatische Retikulum inseriert und bleibt über eine Transmembrandomäne membranverankert. Vom ER aus gelangt es in den Golgi-Apparat. Hier findet die Reifespaltung durch die Subtilase SKI/S1P statt und es bilden sich trimere Glykoproteinkomplexe aus, die zur Zelloberfläche transportiert werden. Es lassen sich dort zwar auch höheroligomere, nicht-gespaltene Glykoproteinkomplexe finden, allerdings werden nur die korrekt prozessierten, trimeren GP-Komplexe in neue Virionen eingebaut (Lenz et al., 2001). Das Z-Protein wird ebenfalls im Zytoplasma synthetisiert und über noch unbekannte Transportwege in der Zelle transportiert. Durch seine Interaktion mit dem Nukleoprotein (Eichler et al., 2004) rekrutiert es die neu entstandenen RNP-Komplexe an den Ort der Virusfreisetzung. Das Z-Protein interagiert auch mit dem Glykoprotein (Capul et al., 2007) und fungiert so als „Brücke“ zwischen dem RNP-Komplex und der Virushülle. Der genaue Ort der Virusassemblierung ist noch unklar. Zwar lässt sich das Glykoprotein in diskreten nicht-*lipid-raft* Mikrodomänen an der Zelloberfläche finden (Agnihothram et al., 2009; Schlie et al., 2010b), eine Interaktion mit dem Z-Protein konnte in transfizierten Zellen jedoch nur an intrazellulären Membranen beobachtet werden (Schlie et al., 2010a). In polarisierten Epithelzellen findet eine gerichtete Virusfreisetzung von der apikalen Seite statt (Cordo et al., 2005; Schlie et al., 2010a). Das Glykoprotein, das in polarisierten Epithelzellen primär apikal lokalisiert, ist in der Lage, Z-NP – Komplexe in apikal freigesetzte virusähnliche Partikel zu rekrutieren und ist somit also vermutlich die treibende Kraft bei der gerichteten Virusfreisetzung (Schlie et al., 2010a).

1.4 Das Nukleoprotein der Arenaviren

Das Nukleoprotein der Arenaviren hat ein Molekulargewicht von 64 kDa und eine Länge von ca. 569 Aminosäuren (Abb. 9). Es ist mit einer Kopienzahl von durchschnittlich 1500 Molekülen pro Virus das in den Virionen häufigste Protein (Strecker et al., 2003; Vezza et al., 1977).

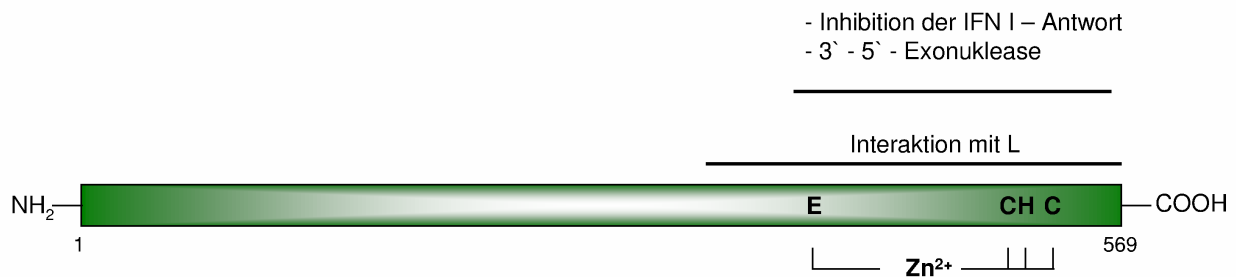


Abb. 9: Strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Nukleoproteins

Schematischer Überblick über die Struktur des Nukleoproteins. Schwarze Balken markieren funktionelle Bereiche innerhalb des Proteins. Details siehe Text. L = virale Polymerase. IFN I = Typ I Interferon.

Die Nukleoproteine humanpathogener Arenaviren rufen in infizierten Individuen häufig eine starke Immunantwort hervor. Patienten, die mit dem Lassavirus infiziert sind, zeigen z.B. bereits nach wenigen Tagen Antikörper gegen das NP (Clegg, 1992). Im Blut dieser Patienten lassen sich auch nach überstandener Infektion NP-spezifische Antikörper nachweisen, die in Individuen aus Endemiegebieten sehr prävalent sind (Günther et al., 2001). Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit zahlreiche Versuche unternommen, diagnostische Testsysteme auf Basis von rekombinantem Nukleoprotein aufzubauen (Saijo et al., 2007).

Zu Beginn der Arbeit war noch wenig über die Struktur des Nukleoproteins sowie die Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion bekannt. In den letzten Jahren haben allerdings zahlreiche Studien dieses Wissen erweitert. Hier soll im Folgenden ein Überblick über den aktuellen Stand der Forschung gegeben werden.

1.4.1 Biologische Funktionen des Nukleoproteins

Das Nukleoprotein übernimmt im viralen Lebenszyklus zahlreiche zentrale Aufgaben. Zu den wichtigsten Funktionen des NP gehört dabei die Enkapsidierung des viralen RNA-Genoms. Durch die Interaktion mit der RNA wird diese vor dem Verdau durch zelluläre Exo- und

Endonukleasen geschützt. Für das LCMV konnte gezeigt werden, dass die virale RNA sowie die Produkte, die bei der Replikation des Genoms entstehen, durch intrazelluläre Rezeptoren der angeborenen Immunantwort, die sog. *pattern recognition receptors* (PRRs) erkannt werden können (Zhou et al., 2010). Durch die Enkapsidierung mit dem Nukleoprotein wird die RNA vor einer derartigen Erkennung geschützt und so indirekt die Induktion einer zellulären Immunantwort inhibiert. Darüber hinaus bilden das virale Genom und das Nukleoprotein zusammen mit der viralen Polymerase L die Ribonukleokapsid-Komplexe, welche in reifende Virionen inkorporiert werden.

Die Polymerase L und das Nukleoprotein sind zusammen die minimalen *trans*-Faktoren zur Transkription und Replikation des viralen Genoms (Hass et al., 2004; Lee et al., 2000; Lopez et al., 2001). Wie genau das Nukleoprotein bei diesen beiden Prozessen involviert ist, ist im Detail noch ungeklärt. Für verschiedene Arenaviren wurde eine direkte Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und der Polymerase nachgewiesen, die in einigen Fällen auch über Speziesbarrieren zwischen den einzelnen Arenaviren hinweg möglich ist (Jacamo et al., 2003; Kerber et al., 2011). Allerdings weisen Untersuchungen an artifiziellen Replikationssystemen für diese Arenaviren, den so genannten Replicon-Systemen, darauf hin, dass diese physikalische Interaktion nicht der alleinige Grund für die Funktion des NP während der Replikation/Transkription des Genoms ist (Kerber et al., 2011). Auch die Interaktion zwischen der RNA und dem Nukleoprotein ist von Bedeutung, da sowohl die genomische als auch die antigenomische RNA durch das Nukleoprotein enkapsidiert sein müssen, um als Vorlage für die Replikation und Transkription zu dienen (Lopez et al., 2001; Pinschewer et al., 2003).

Anfängliche Studien wiesen dem NP eine regulatorische Funktion zu, bei der die intrazelluläre Menge an NP bei steigender Konzentration ein „Umschalten“ zwischen dem Herstellen von viralen mRNAs und der Produktion voller-Länge Antigenome und Genome bewirkt. Da virale mRNAs an der intergenischen Region terminieren, während genomische und antigenomische RNA die gesamte Länge des viralen Genoms umfassen, wurde vermutet, dass eine Assoziation des NP mit der IGR oder die Interaktion des Nukleoproteins mit der Polymerase eine anti-terminatorische Funktion haben und dazu führen, dass volle-Länge Transkripte hergestellt werden (Tortorici et al., 2001a). Allerdings zeigten weiterführende Untersuchungen, dass bei steigender intrazellulärer NP-Konzentration sowohl Transkription als auch Replikation gleichermaßen erhöht werden (Pinschewer et al., 2003). Dies bedeutet, dass das Nukleoprotein bei beiden Prozessen eine Rolle spielt, ohne dass es zu einem NP - vermittelten Umschalten zwischen Transkription und Replikation kommt. Daher wird angenommen, dass die An- oder Abwesenheit einer 5'-terminalen Cap-Struktur an den entstehenden Transkripten darüber entscheidet, ob virale mRNAs oder

genomische und antigenomische RNAs gebildet werden. Das Nukleoprotein enkapsidiert dabei nur RNA-Spezies, die nicht mit einer Cap-Struktur versehen sind, was dazu führt, dass die IGR bei der Transkription überlesen wird. Dadurch entstehen volle-Länge RNAs, die durch das NP enkapsidiert sind und somit ihrerseits als Vorlagen für Transkription und Replikation dienen können.

Neben der indirekten Inhibition der zellulären Immunantwort durch die Enkapsidierung des viralen Genoms wurde für das NP verschiedener Arenaviren auch eine aktive Inhibition der Induktion der sog. Typ I Interferonantwort beobachtet. Diese ist Teil des angeborenen Immunsystems und für die Abwehr einer Infektion mit Viren und Bakterien von großer Bedeutung. Dabei werden bestimmte Bestandteile der jeweiligen Pathogene, wie z.B. doppelsträngige RNA, durch PRRs erkannt. Dies führt über unterschiedliche Signalkaskaden zu der Produktion und Sekretion von speziellen Chemokinen, den so genannten Interferonen (IFN). Diese Interferone sind ihrerseits in der Lage, einen antiviralen Status in Zellen der näheren Umgebung hervorzurufen und wirken zudem autokrin auf die produzierende Zelle zurück (Perry et al., 2005). Daher kodieren viele verschiedene Viren für Proteine, welche in diese Signalkaskaden eingreifen und somit die Produktion und Sekretion von Typ I Interferonen inhibieren (Versteeg and García-Sastre, 2010). Frühe Studien zeigten für verschiedene Arenaviren, dass die Produktion der Typ I Interferone, insbesondere des Interferon β während einer Infektion relativ niedrig ist. Mäuse, die chronisch mit LCMV infiziert sind, weisen trotz einer hohen Virusreplikation eine sehr geringe Produktion von Typ I Interferonen auf und die Infektion von humanen Leberzellen oder dendritischen Zellen mit Lassaviren führt gleichfalls nur zu einer moderaten Expression und Sekretion von Typ I Interferonen (Baize et al., 2006; Müller et al., 2007).

Im Falle des LCMV zeigten Untersuchungen an NP-transfizierten Zellen, dass das Nukleoprotein dieses Virus in der Lage ist, die Induktion einer Typ I Interferon-Antwort zu hemmen (Martínez-Sobrido et al., 2006). Diese Beobachtung konnte auch auf die Nukleoproteine verschiedener anderer Alt- und Neuweltarenaviren mit Ausnahme des Tacaribevirus übertragen werden. Daher wird angenommen, dass das Nukleoprotein der primäre Typ I Interferon – Antagonist der Arenaviren ist (Martínez-Sobrido et al., 2007). Die Interferon-Antagonisten der meisten Viren interagieren mit einzelnen zellulären Molekülen, die Teil der für die Induktion einer Interferon-Antwort verantwortlichen Signalkaskade sind. Das Nukleoprotein der Arenaviren bildet hier allerdings eine ungewöhnliche Ausnahme. Mutationsanalysen ergaben, dass einige wenige Aminosäuren für die Aktivität des NP als Interferon-Antagonist ausschlaggebend sind (Martínez-Sobrido et al., 2009). Erstaunlicherweise zeigte die erst kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur des Nukleoproteins des Lassavirus (siehe Abb. 10), dass diese Aminosäuren Teil einer in der C-terminalen

Proteindomäne gelegenen, dsRNA-spezifischen 3'-5' - Exonuklease sind (Hastie et al., 2011a; Qi et al., 2010). Diese ist innerhalb der Arenaviren hochkonserviert und baut doppelsträngige RNA-Intermediate ab, die während der Replikation des viralen Genoms entstehen. Dadurch wird verhindert, dass diese durch PRRs erkannt werden. Ein solcher, sehr basal angreifender Mechanismus zur Hemmung der Typ I Interferonantwort wurde bisher nur für die Arenaviren beschrieben.

Darüber hinaus übernimmt das NP nicht nur Funktionen bei der Replikation und Enkapsidierung des viralen Genoms, sondern ist auch am Zusammenbau neuer Virionen beteiligt. Durch eine Interaktion des Nukleoproteins mit dem Matrixprotein Z, das die innere Virushülle auskleidet, werden die im Zytoplasma der Zelle gebildeten RNP-Komplexe an die Plasmamembran rekrutiert und so in reifende Virionen eingebaut (Eichler et al., 2004; Livingston Macleod et al., 2011; Schlie et al., 2010a; Shtanko et al., 2010). Eine Besonderheit ist die Funktion der NP-Z Interaktion beim Tacaribevirus. Während das Matrixprotein bei den meisten Arenaviren die treibende Kraft bei der Virusfreisetzung ist, zeigten Untersuchungen am Z-Protein des Tacaribevirus, dass die Ko-Expression des Nukleoproteins zu einer signifikanten Steigerung der Freisetzung virus-ähnlicher Partikel führt (Groseth et al., 2011). Daher wird vermutet, dass das Nukleoprotein des Tacaribevirus zudem eine unterstützende Funktion bei der Bildung und Abknospung reifer Virionen hat.

Zusätzlich zu den Funktionen bei der Genom-Replikation und der Regulation der zellulären Immunantwort wurde den Nukleoproteinen einzelner Arenaviren eine Rolle bei der Ausbildung einer persistenten Infektion zugewiesen. Zellen, die das NP des Junivirus exprimieren sind resistent gegenüber einer Überinfektion mit anderen Arenaviren und lassen sich nicht mehr mit dem Junivirus infizieren (Ellenberg et al., 2004). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass persistent mit dem LCMV infizierte Zellen stets hohe intrazelluläre NP-Konzentrationen aufweisen (Pinschewer et al., 2003). Das Nukleoprotein bestimmter LCMV-Stämme ist außerdem in der Lage, durch eine Interaktion mit dem zellulären Protein Keratin 1 das intrazelluläre Keratin-Netzwerk zu stabilisieren. Dies führt vermutlich zu einer verstärkten Ausbildung von zellulären Protrusionen und interzellulären Kontakten, über die die Ausbreitung des LCMV und somit die Ausbildung einer persistenten Infektion erleichtert wird (Labudova et al., 2009).

1.4.2 Struktur des Nukleoproteins

Zu Beginn dieser Arbeit war über die räumliche Struktur des Nukleoproteins der Arenaviren, besonders des Lassavirus nichts Näheres bekannt. Frühe Studien am NP des Junivirus zeigten, dass dieses zweiwertige Metall-Ionen binden kann, mit einer starken Präferenz für

Zink (Tortorici et al., 2001b). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für das Nukleoprotein des LCMV gemacht (Salvato and Shimomaye, 1989). Untersuchungen hinsichtlich einer funktionellen Bedeutung dieser Metall-Bindung lagen nicht vor.

Strukturinformation über ein Nukleoprotein der Arenaviren lieferte die erst kürzlich erfolgte Kristallisation und Auflösung der 1,8Å - Struktur des Nukleoproteins des Lassavirus² (Qi et al., Dez. 2010). Diese Struktur zeigte, dass das Nukleoprotein des Lassavirus aus einer N- und einer C-terminalen Domäne besteht, die über eine flexible, unstrukturierte Region des Proteins miteinander verbunden sind (Abb. 10).

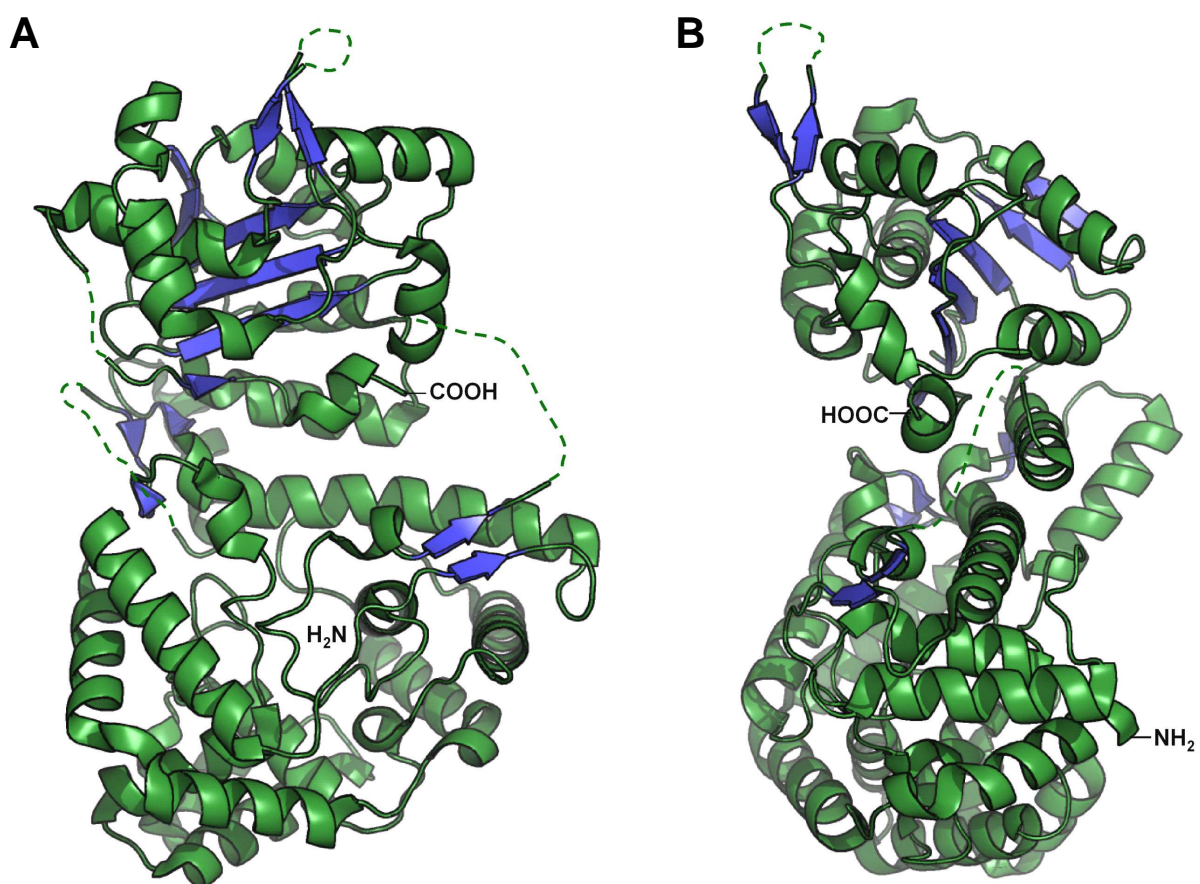


Abb. 10: Röntgenkristallstruktur des Nukleoproteins des Lassavirus

(A) Frontansicht und (B) Seitenansicht des Lassavirus-Nukleoproteins (PDB: 3MWP; Qi et al, Dez. 2010). α-Helices sind dunkelgrün eingefärbt, β-Faltblätter blau. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol erstellt. Gestrichelte Linien stellen Bereiche dar, die durch die Strukturaufklärung nicht erfasst wurden. Die Position des N- und des C-Terminus ist angezeigt.

In der N-terminalen Domäne befindet sich eine tiefe, positiv geladene Tasche, von der ursprünglich angenommen wurde, dass es sich um eine Nukleotid-Bindetasche handelt, über

2: Die Strukturaufklärung wurde während der vorliegenden Arbeit publiziert; die Arbeit selbst basiert auf Strukturvorhersagen.

welche das Nukleoprotein 5' - terminale Cap-Strukturen binden könnte (Qi et al., 2010). Spätere Untersuchungen zeigten aber, dass es sich bei dieser Struktur um die RNA-Bindetasche des Nukleoproteins handelt, über die es wahrscheinlich mit der viralen RNA interagiert (Hastie et al., 2011b). In der C-terminalen Domäne des Nukleoproteins befindet sich ein Zink-Finger, der ein einzelnes Zink-Ion koordiniert, sowie eine 3' - 5' - Exonuklease. Die an der Bildung dieser Exonuklease beteiligten Aminosäuren sind innerhalb der Arenaviren hoch konserviert. Eine derartige enzymatische Funktion wurde für kein anderes Nukleoprotein innerhalb und außerhalb der RNA-Viren beschrieben und stellt eine Besonderheit der Arenaviren dar. Diese Exonuklease ist verantwortlich für die Funktion des NP als Antagonist der Typ I Interferon-Antwort (siehe 1.4.1). Abgesehen von diesen beiden Funktionen konnten allerdings noch keine anderen funktionellen Domänen auf die Struktur des Nukleoproteins übertragen werden. Auch über den Zusammenhang zwischen der Bildung von Oligomeren und der Funktionalität des Nukleoproteins war nichts bekannt. Diese Beobachtungen waren die Grundlage für die vorliegende Arbeit.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Eine der zentralen Aufgaben des Nukleoproteins des Lassavirus ist die Bildung von RNP-Komplexen. Darüber hinaus übernimmt das Nukleoprotein weitere wichtige Funktionen im viralen Replikationszyklus. Diese beinhalten die regulatorische Wirkung bei der Transkription und Replikation des Genoms, die Interaktion mit dem Matrixprotein und die Inhibierung der zellulären Interferon-Antwort. Die Rolle der Nukleoprotein-Oligomerisierung für diese Prozesse ist jedoch unbekannt. Ebenso ist nicht bekannt, welche Arten von Oligomeren das NP in Abwesenheit viraler RNA bildet und welche Domänen innerhalb des Nukleoproteins für die Oligomerisierung und den zentralen Schritt der Z-vermittelten Rekrutierung der RNPs in neue Virionen verantwortlich sind.

Aus diesem Grund sollte die NP-Oligomerisierung sowie die Interaktion des Nukleoproteins mit dem Z-Protein in dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Der Fokus lag dabei auf den folgenden Fragestellungen:

1. Welche Arten von Oligomeren bildet das NP?

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, die Bildung von NP-Oligomeren näher zu charakterisieren. Dabei sollte untersucht werden, welche Arten von Oligomeren das Nukleoprotein in Abwesenheit von viraler RNA bilden kann und wie diese Oligomere aussehen. Da das Nukleoprotein des Lassavirus zahlreiche potentielle

Phosphorylierungsstellen aufweist, sollte zudem überprüft werden, ob posttranslationale Modifikationen einen Einfluss auf die Oligomerisierung des NP haben. Dazu sollte das Nukleoprotein in Bakterien und Säugerzellen exprimiert und die durch das NP gebildeten Oligomere analysiert werden.

2. Welche Bereiche des Nukleoproteins sind für die NP-NP-Interaktion wichtig?

Das zweite Ziel der Arbeit war die Identifizierung der an der NP-NP-Interaktion beteiligten Domänen innerhalb des Nukleoproteins. Dazu sollten verschiedene Deletions- und Punkt-Mutanten des Nukleoproteins hergestellt und hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur NP-NP-Interaktion untersucht werden.

3. Welche Bedeutung hat die NP-NP-Interaktion für dessen biologische Funktionen?

Das dritte Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der biologischen Bedeutung der NP-NP-Interaktion für die bereits bekannten Funktionen des Nukleoproteins. Geeignete Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, die homotypische NP-Interaktion zu vermitteln, sollten dazu in verschiedenen Testsystemen eingesetzt werden, um zu überprüfen, ob sich eine fehlende NP-NP-Interaktion auf die Funktionalität des Nukleoproteins bei der Replikation des viralen Genoms, der Interaktion mit dem Matrixprotein oder bei der Inhibierung der Typ I Interferon-Antwort auswirkt.

4. Wie findet die Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und dem Matrixprotein statt?

Das vierte Ziel der Arbeit war die detaillierte Charakterisierung der NP-Z-Interaktion. Der Fokus lag dabei auf der Identifizierung der Domänen innerhalb des NP, die diese Interaktion vermitteln. Dazu sollten Interaktionsstudien zwischen verschiedenen Nukleoprotein-Mutanten und wildtypischem Z durchgeführt werden. Auf Basis dieser Ergebnisse und der bereits für das Z-Protein publizierten Untersuchungen sollte ein Modell für die durch die NP-Z-Interaktion vermittelte Verankerung der viralen RNP-Komplexe an der Virusmembran etabliert werden.

5) Gibt es speziesübergreifende NP-NP und NP-Z – Interaktionen?

Das fünfte Ziel der Arbeit war es, die NP-NP sowie die NP-Z – Interaktion zwischen den Nukleoproteinen bzw. Matrixproteinen verschiedener Arenaviren zu untersuchen. Dazu sollten Interaktionsstudien zwischen Nukleoproteinen verschiedener Arenaviren durchgeführt werden. Darüber hinaus sollte der Einbau des Nukleoproteins in Z-induzierte VLPs bei Verwendung verschiedener NP-Z-Kombinationen analysiert werden. Diese Untersuchungen sollten einen Hinweis auf die Funktion der NP-NP und NP-Z – Interaktion bei der Bildung von Arenavirus-Reassortanten liefern.

2. Material

2.1 Chemikalien

Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose, NA	Life Technologies, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, Richmond (USA)
Ampicillin (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto -Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto-Trypton	Merck Eurolab, Darmstadt
Borsäure	Fisher Scientific, Schwerte
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calcium chlorid (CaCl_2)	Merck Eurolab, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Complete</i> TM (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Fisher Scientific, Schwerte
Dimethyl sulfoxid (DMSO)	WAK Chemie, Steinbach
DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindol)	Life Technologies, Darmstadt
Essigsäure	Merck Eurolab, Darmstadt
Ethanol (abs. EtOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hefe extrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Merck Eurolab, Darmstadt
Kalium chlorid (KCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck Eurolab, Darmstadt
Lipofektamine TM 2000	Life Technologies, Darmstadt
Mager milchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Maltose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Manganchlorid (MnCl_2)	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natrium chlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe

Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Eurolab, Darmstadt
dNTP-Mix (10 mM each)	Fermentas, St. Leon-Rot
Nonidet P40 (NP40)	Merck Eurolab, Darmstadt
OptiMEM	Gibco BRL, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	SERVA, Heidelberg
Protein A – Sepharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Saccharose	SERVA, Heidelberg
N, N, N', N' -Tetramethylethylen- diamin (TEMED)	Biorad, Richmond (USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Base)	Acros Organics, Geel (BE)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe
Turbofect™	Fermentas, St. Leon-Rot

2.2 Verbrauchsmaterialien

Chromatographie-Papier	Whataman, Dassel
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Kanüle Microlance (22G)	Becton Dickinson, Fraga (ESP)
Kohlenstoff-beschichtete Kupfer- Netzchen für Elektronenmikroskopie	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Nitrocelluloseacetatfolie (NTA)	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Reagiergefäß, 1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell Feather Disposable Scalpel	Feather BLDG, Osaka, Japan
TipOne Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
Zellkulturflaschen (25cm^2 , 75cm^2 und 162cm^2)	Costar, Cambridge (USA)
Zellkulturplatten (6 Vertiefungen)	Greiner, Nürtingen
Zellkulturplatten (6- und 10 cm-Schalen)	Greiner, Nürtingen
SW60 Zentrifugenröhrchen Ultraclear für Ultrazentrifugen	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifugationsfilter (Centricon-10K)	Millipore, Schwalbach

2.3 Kommerziell erhältliche Reaktionsansätze (Kits)

HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
PeqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
Z-Competent E.coli Transformation Kit™ and Buffer Set	Zymo Research, Orange (USA)

2.4 Geräte

ÄKTAPrime FPLC	GE Healthcare, München
Brutschrank HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Centro LB 960 Luminometres	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Elektrophoreseapparatur, 6x8cm	Keutz, Reiskirchen
Elektrotransferapparatur (Blotkammer)	Keutz, Reiskirchen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
GelDoc 2000	Biorad, Richmond (USA)
Genepulser Elektroporator X-cell	BioRad, München
Gradientenmischer	Amersham Pharmaceuticals
Elektronenmikroskop Zeiss 109	Zeiss, Göttingen
Nanodrop 3300	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Lichtmikroskop Wilovert	Will, Wetzlar
Odyssey™ <i>Infrared Imaging System</i>	LI-COR® Biosciences, Bad Homburg
pH-Meter HI208	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Photometer Lightwave II	Biochrom WPA, Cambridge, USA
Primus Thermocycler	MWG Biotech AG, Ebersberg
Tischzentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Ultrazentrifuge Avanti J-26XP	Beckman Coulter, Krefeld

Ultraschallkonus Sonifier 450
Vortexer Reax 2000

Branson, Danbury, USA
Heidolph, Schwabach

2.5 Größen – und Mengenstandards

MassRuler™ DNA-ladder Mix
Prestained High Molecular Weight Marker
PageRuler Prestained Protein Ladder
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder

MBI-Fermentas, St.Leon-Rot
GE Healthcare, München
MBI-Fermentas, St.Leon-Rot
MBI-Fermentas, St.Leon-Rot

2.6 Enzyme

Genenase I
Pfu-Turbo™ DNA-Polymerase
PfuUltra II Fusion HS Polymerase
Proteinase K
Restriktionsendonukleasen
(EcoRI, XhoI, BglII, BamHI, NcoI)
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)
T4-DNA-Ligase

NEB, Schwalbach
Stratagene, Heidelberg
Stratagene, Heidelberg
Fermentas, St. Leon-Rot
Fermentas, St. Leon-Rot

Fermentas, St. Leon-Rot
Fermentas, St. Leon-Rot

2.7 Oligonukleotide für PCR (Primer)

Alle Primer wurden durch die Firma MWG/Operon synthetisiert. Sie sind im Folgenden in 5' → 3' – Richtung aufgeführt.

2.7.1 Oligonukleotid-Primer zur Klonierung des wildtypischen Nukleoproteins in den pCAGGS - Vektor

<u>Name</u>	<u>Sequenz 5' → 3'</u>
NP wt EcoRI fw	GGGGAATTCATGAGTGCCTCAAAGGAAATAAAATCC
NP wt HA BglII rev	GAAGATCTTCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGA GAACGACT
NP wt Flag EcoRI fw	CCGGAATTCCC GGATGGACTATAAGGACGATGACGATAAGG GTATG AGTGCCTCAAAGGAAATAAAATCC
NP wt XhoI rev	GGGCTGAGTCATTACAGAACGACTCTAGGTGTCTG

2.7.2 Oligonukleotid-Primer zur Herstellung verkürzter Nukleoprotein-Mutanten im pCAGGS – Vektor

<u>Name</u>	<u>Sequenz 5' → 3'</u>
NP Δ1-86 EcoRI fw	CCCGAATTCGCATGAAGAGTATACTGAGA
NP Δ1-166 EcoRI fw	CGGAATTCCGGATGAAAAATGCAGAGTTG
NP Δ1-227 EcoRI fw	CGGAATTCCGATGCCCATCCTAAATATG
NP Δ1-312 EcoRI fw	CTTGGAATCCCTTTGTCAGGAGATGGA
NP Δ564-569 BglI rev	CGGTACCTCACTTATCGTCATCGTCCTTATAGTCTGTCGATG TTCTGAAC
NP Δ559-569 BglI rev	CGGTACCTCACTTATCGTCATCGTCCTTATAGTCCACCATATC TCTGGGC
NP Δ550-569 BglI rev	CGGTACCTCACTTATCGTCATCGTCCTTATAGTCCAAAACCG ATGTGTTC
NP Δ540-569 BglI rev	CAGATCTTCACTTATCGTCATCGTCCTTATAGTCCACTGCTGC ATCAAAC
NP Δ455-569 BglI rev	TCAGATCTTCTCACTTATCGTCATCGTCCTTATAGTCAACCCC GGGGGAGTGCATCAAT
NP Δ382-569 BglI rev	AAGATCTTCTACTTATCGTCATCGTCCTTATAGTCTGGGTCAA GTTGCA
NP Δ341-569 BglI rev	AAGATCTTCTACTTATCGTCATCGTCCTTATAGTCTGGCTTCC CATCTG

2.7.3 Oligonukleotid-Primer zur Herstellung von Nukleoprotein - Punktmutanten mittels Quickchange – Mutagenese

<u>Name</u>	<u>Sequenz 5' → 3'</u>
NP L70A (m1) fw	AAACGGTTGAGGGACGCAAATCAAGCGGTCAAC
NP L70A (m1) rev	GTTGACCGCTTGATTTGCGTCCCTCAACCGTTT
NP L67/70A (m2) fw	GACAATGATTTGAAACGGGCGAGGGACGCAAATCAAGCGGT CAACAAT
NP L67-77A (m3) fw	CGAGGGACGCAAATCAAGCGGCCAACAATGCTGTTGAATTA AAATCAACTCAA
NP L67-77A (m3) rev	TTGAGTTGATTTTAATTCAACAGCATTGTTGGCCGCTTGATTT GCGTCCCTCG
NP L99A (m4) fw	CTAACCTCAGATGACGCATTAATCTTAGCCGCT

NP L99A (m4) rev	AGCGGCTAAGATTAATGCGTCATCTGAGGTTAG
NP L99/102A (m5) fw	ACCTCAGATGACGCATTAATCGCAGCCGCTGATCTA
NP L99/102A (m5) rev	TAGATCAGCGGCTGCGATTAATGCGTCATCGAGGT
NP R52A (m6) fw	TCAGTAATGTTCAAGCGTTGATGCGCAAGGA
NP R52A (m6) rev	TCCTTGCGCATCAACGCTTGAACATTACTGA
NP D500A (m7) fw	GAAAATGCAGTCTGGGCCCAGTATAAAGACTTA
NP D500A (m7) rev	TAAGTCTTTATACTGGGCCCAGACTGCATTTTC

2.7.4 Oligonukleotid-Primer zur Klonierung des wildtypischen Nukleoproteins in den pMalc2g - Vektor

<u>Name</u>	<u>Sequenz 5' → 3'</u>
NP wt pMal BamHIrev	TACGGGATCCGCGATTACAGGACGACTCT

2.7.4 Oligonukleotid-Primer zur Klonierung des wildtypischen Nukleoproteins und von Nukleoprotein-Mutanten in den pCITE2/4 – Vektor

<u>Name</u>	<u>Sequenz 5' → 3'</u>
NPwt pCITE NcoI fw	GGCCATGGCAAGTGCCTCAAAGGAAATAAAATCCTTTTT
NPΔ1-86 pCITE NcoI fw	GGCCATGGGTAAGAGTATACTGAGA

2.7.6 Sequenzierprimer

<u>Name</u>	<u>Sequenz 5' → 3'</u>
Sequenzierprimer für den pCAGGS - Vektor	
pCAGGS for	CCTTCTTCTTTTTCCTACAG
pCAGGS rev	CCTTTATTAGCCAGAAGTCAGATGC

Sequenzierprimer für den pMalc2g - Vektor

pMal 2571-2591 for	GATCAACGCCGCCAGCGGTC
pMal 2761-2781 rev	CCAGGGTTTTCCCAGTCACG

Sequenzierprimer für den pCITE2/4 - Vektor

T7 EEV fw	AAGGCTAGAGTACTTAATACGA
T3 Prom rev	ATTAACCCTCACTAAAGGGA

2.8 Vektoren

pCAGGS	eukaryotischer Expressionsvektor für Säugerzellen, enthält den CMV-Promotor, mit freundlicher Genehmigung von Dr. J. Miyazaki, Osaka, Japan (Niwa et al., 1991).
pMalc2g	bakterieller Expressionsvektor, enthält den offenen Leserahmen des <u>M</u> altose- <u>B</u> indungsproteins (MBP), ermöglicht so die Fusion eines gewünschten Proteins auf Genebene an den C-Terminus des Maltose-Bindungsproteins, Abspaltung über durch Vektor kodierte Genenase I – Schnittstelle möglich, New England Biolabs
pCITE-2/4	Kombination aus den Vektoren pCITE2a und pCITE4a, ermöglicht die Expression von Proteinen unter Kontrolle eines T7-Promotors, enthält eine internal ribosomal entry site (IRES) sowie eine Kozak-Sequenz, erhalten von Prof. Dr. Stephan Günther, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg (Hass et al., 2004).

2.9 rekombinante Plasmide

pCAGGS – LASV-NP	kodiert für das Nukleoprotein des Lassavirus (Stamm Josiah), erhalten von Dr. Oliver Lenz, AG Prof. Dr. Garten, Marburg (Lenz et al., 2001)
pCAGGS – LASV(AV)-NP	erhalten von Dr. Oliver Lenz, AG Prof. Dr. Garten, Marburg
pCAGGS – LASV-Z	kodiert für das Matrixprotein des Lassavirus (Stamm Josiah), erhalten von Dr. Thomas Strecker, AG Prof. Dr. Garten, Marburg (Strecker et al., 2003).
pCAGGS – TCRV-Z	kodiert für das Matrixprotein des Tacaribevirus, erhalten von Dr. Allison Groseth und Svenja Wolff (Groseth et al, 2011), AG Prof. Dr. Becker, Marburg

pCAGGS – TCRV-NP	kodiert für das Nukleoprotein des Tacaribevirus, erhalten von Dr. Allison Groseth und Svenja Wolff (Groseth et al, 2011), AG Prof. Dr. Becker, Marburg
pCAGGS – JUNV-Z	kodiert für das Matrixprotein des Juninvirus, erhalten von Dr. Allison Groseth und Svenja Wolff (Groseth et al, 2011), AG Prof. Dr. Becker, Marburg
pCAGGS – JUNV-NP	kodiert für das Nukleoprotein des Juninvirus, erhalten von Dr. Allison Groseth und Svenja Wolff (Groseth et al, 2011), AG Prof. Dr. Becker, Marburg
pCAGGS – MACV-Z	kodiert für das Matrixprotein des Machupovirus, erhalten von Dr. Thomas Strecker, AG Prof. Dr. Garten, Marburg
pCAGGS – FluA - NP	kodiert für das Nukleoprotein des Influenzavirus A/Thailand/1(KAN-1)/04 (H5N1) (Puthavathana et al., 2005), erhalten von Prof. Dr. H.D. Klenk, Marburg
pCAGGS – EBOV- NP	kodiert für das Nukleoprotein des Ebolavirus (EBOV), erhalten von Dr. Nadine Biedenkopf, AG Prof. Dr. Becker, Marburg

2.10 Antikörper

2.10.1 Primärantikörper

α -LASV-NP	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, gerichtet gegen das Epitop NH ₂ -LMRKERRDDNDLKRLRDLNQAVC-COOH im N-Terminus des Lassavirus Nukleoproteins, Immunoglob, Himmelstadt
α -LASV-Z	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, gerichtet gegen das Epitop NH ₂ -CGAADSIRPPPYSP-COOH im C-Terminus des Lassavirus Z-Proteins, vgl. Dissertation Dr. Thomas Strecker, erhalten von Dr. Thomas Strecker und Prof. Dr. Wolfgang Garten, Marburg
α -HA (Maus)	monoklonaler Antikörper aus der Maus, gerichtet gegen den HA-tag (YPYDVPDYA), Covance, New Jersey (USA)

α -HA (Kaninchen)	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, gerichtet gegen den HA-tag (YPYDVPDYA), Sigma-Aldrich, Steinheim
α -Flag (Maus)	monoklonaler Antikörper aus der Maus, gerichtet gegen den Flag-tag (DYKDDDDK), Sigma-Aldrich, Steinheim
α -Flag (Kaninchen)	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, gerichtet gegen den Flag-tag (DYKDDDDK), Sigma-Aldrich, Steinheim
α -Tubulin (Maus)	monoklonaler Antikörper aus der Maus, gerichtet gegen die α -Untereinheit des Tubulins, Sigma-Aldrich, Steinheim
α -KP-Virus (Kaninchen)	polyklonales Kaninchenserum, gerichtet gegen das KP– Virus (Influenzavirus A/FPV/Rostock/34 (H7N1)), erhalten von Prof. Dr. Wolfgang Garten, Marburg

2.10.2 Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen IgG (Ziege), Alexa 680-gekoppelt	Molecular Probes, Eugene, USA
Anti-Maus IgG (Ziege), Alexa 680-gekoppelt	Molecular Probes, Eugene, USA
Anti-Kaninchen IgG (Ziege), IRDye 800-gekoppelt	Rockland, Gilbertsville, USA
Anti-Maus IgG (Ziege), IRDye 800-gekoppelt	Rockland, Gilbertsville, USA
Anti-Maus IgG (Hühnchen), FITC-gekoppelt	Life Technologies, Darmstadt
Anti-Kaninchen IgG (Esel), FITC-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG (Ziege), Cy5-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch, USA

2.11 Bakterien

<i>E. coli</i> Stamm XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac (F' proAB ⁺ , lacIqZAM15, Tn10, (Tetr)) Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> Stamm BL21	F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal [malB ⁺] _{K-12} (λ^S) Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> Stamm BL21-Rosetta	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm pRARE (Cam ^R) EMD4Biosciences, Merck, Darmstadt

2.12 Eukaryotische Zellen

HEK293T – Zellen	permanente Zelllinie, ursprünglich isoliert aus humanem, epithelialem Nierengewebe, exprimieren konstitutiv das „large T-Antigen“ des Simian virus (SV) 40 (DuBridge et al., 1987)
HuH7 - Zellen	permanente Zelllinie, ursprünglich isoliert aus humanem Leberkarzinomgewebe JCRB (<u>J</u> apanese <u>C</u> ollection of <u>R</u> esearch <u>B</u> ioresources) - Nummer: 0403 (Nakabayashi et al., 1982)
BSR T7/5-Zellen	permanente Zelllinie, modifizierte BHK-21-Zellen (<u>B</u> aby <u>H</u> amster <u>K</u> idney, ATCC (<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection) - Nummer: CCL-10), die konstitutiv die T7-Polymerase unter Kontrolle des Cytomegalievirus-Promotors exprimieren (Buchholz et al., 1999)

2.13. Medien und Puffer

2.13.1 Puffer

Bindepuffer für die Aufreinigung von MBP- Fusionsproteinen (pH 7,4)	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
	Glyzerin	10 %
	dH ₂ O	ad 1l
Elutionspuffer für die Aufreinigung von MBP- Fusionsproteinen (pH 7,4)	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
	Glyzerin	10 %
	Maltose	10 mM
	dH ₂ O	ad 1l
Co-Immunpräzipitations- Puffer (COIP-Puffer) (pH 7,4)	Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA pH 8,0	5 mM
	NP40	1%
	dH ₂ O	ad 250 ml

2. Material

Coomassie-Färber	Coomassie G-250	16 Tabletten
	Ethanol	400 ml
	Essigsäure	100 ml
	dH ₂ O	ad1l
Coomassie-Entfärber	Ethanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
		ad1l dH ₂ O
PBS _{def}	NaCl	8,00 g
(Phosphatpuffer	KCl	0,20 g
deficient)	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
(pH 7,0)	KH ₂ PO ₄	0,20 g
	dH ₂ O	ad 1 l
PBS++	MnCl ₂	0,1 g
	CaCl ₂	0,13 g
	PBS _{def}	ad 1 l
10x Laufpuffer für SDS-	SDS	10 g
PAGE	Tris-Base	30 g
(pH 7,4)	Glyzin	144 g
	dH ₂ O	ad 1l
4x SDS-Probenpuffer	0,5M Tris/HCl pH6,8	4 ml
	SDS	0,4 g
	Glyzerin	4 ml
	2% Bromphenolblau	0,1 ml
	β-Mercaptoethanol	0,4 ml
	dH ₂ O	1,2 ml
10x TBE – Puffer	Tris-Base	108 g
(pH 7,4)	Borsäure	55 g
	0,5 M EDTA, pH 8,0	4 ml
	dH ₂ O	ad 1 l
0,5 M Tris/HCl	Tris-Base	30,3 g
0,4 % SDS	20 % SDS	10 ml
pH 6,8	dH ₂ O	ad 500ml
	mit HCl auf pH 6,8	
	einstellen	

2. Material

1,5 M Tris/HCl	Tris-Base	90,9 g
0,4 % SDS	20 % SDS	10 ml
pH 8,8	dH ₂ O	ad 500ml
	mit HCl auf pH 8,8 einstellen	
Western Blot –	Tris-Base	5,8 g
Transferpuffer	Glyzin	2,9 g
(pH 7,2)	Ethanol	200 ml
	dH ₂ O	ad 1l

2.13.2 Wachstumsmedien für Bakterien

LB-Medium	Bacto-Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	dH ₂ O	ad 1 l
RB-Medium	Bacto-Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	dH ₂ O	ad 1 l
LB-Agar	Bacto-Agar	3,75 g
	LB-Medium	ad 250 ml

Zugabe von Antibiotika erfolgt nach Autoklavieren und
Abkühlen der Lösung auf 50°C

2.13.2 Wachstumsmedien und Zusätze für eukaryotische Zellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM (100x)	Gibco BRL, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco BRL, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Karlsruhe

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, um spezifisch DNA-Fragmente zu vervielfältigen (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Die PCR umfasst im ersten Schritt die Hybridisierung, d.h. Anlagerung sequenzspezifischer, kurzer Oligonukleotide (Primer) an die komplementären Enden der entsprechenden Zielsequenzen (Template). Im Anschluss an diesen als *Annealing* bezeichneten Prozess erfolgt die Amplifizierung durch eine spezifische DNA-Polymerase. Diese Schritte werden zyklisch durchlaufen, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung der gewünschten Zielsequenz erreicht wird.

3.1.2 Reaktionansätze für die PCR

Alle PCR-Reaktionen wurden mit der aus *Pyrococcus furiosus* isolierten Pfu-Polymerase durchgeführt, da diese Polymerase eine hohe Fehlergenauigkeit aufweist (Lundberg et al., 1991). Die verwendeten Reagenzien stammten von der Firma Stratagene.

Reaktionsansatz

Pfu Turbo Polymerase (2,5 U/μl)	1 μl
Pfu Reaktionspuffer (10x)	5 μl
dNTP-Mix (10 mM each)	1,25 μl
Template-DNA	100 ng
Oligonukleotid-Primer	je 100 pmol
ddH ₂ O	ad 50μl

PCR-Parameter

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
Denaturierung vor dem 1. Zyklus	95°C	2 min.	1
Denaturierung	95°C	30 sec.	30
Hybridisierung	55 - 64°C	30 sec.	
Elongation	72°C	2 min pro 1 kb	
Finale Elongation	72°C	10 min.	1

3.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Analyse von DNA wurde ein Gel aus einer 1%igen Agarose-Lösung (w/v) in 1x TBE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 6x konzentriertem DNA-Probenpuffer versetzt und im Gel bei 5V/cm für ca. 1,5 h aufgetrennt. Zum Färben wurde das Gel für 30 min in 1x TBE-Puffer mit 0,00003% (v/v) Ethidiumbromid geschwenkt. Die Banden wurden unter UV – Licht bei 360 nm visualisiert.

3.1.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die DNA wie unter 3.1.3 beschrieben aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Anschließend wurden die gewünschten Banden unter langwelligem UV – Licht bei 360 nm markiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit dem *Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen oder dem PeqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit (Peglab) aus den Gelstücken extrahiert und in 50µl ddH₂O aufgenommen.

3.1.5 Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA

Um DNA in ein Plasmid mittels Ligation einzubringen, müssen Vektor und das in diesem Fall als Insert bezeichnete DNA-Fragment zuerst mit geeigneten, sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut werden. In dieser Arbeit wurden dabei Enzyme verwendet, die überhängende 3' - Enden (*sticky ends*) erzeugen, über welche nachfolgend eine Ligation stattfinden kann.

Für die Klonierung von PCR-Produkten in Expressionsvektoren wurden diese wie unter 3.1.4 beschrieben mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut. Entsprechende Enzyme wurden auch zum Verdau des Zielvektors verwendet. Die verwendeten Reagenzien stammten von der Firma Fermentas.

Reaktionsansätze

Verdau von PCR-Fragmenten		Verdau vektorieller DNA	
Restriktionsenzym	je 1 µl	Restriktionsenzym	je 1 µl
Reaktionspuffer (10x)	5 µl	Reaktionspuffer (10x)	2 µl
PCR-Fragment	0,5 µg	vektorielle DNA	2 µg
ddH ₂ O	ad 50 µl	ddH ₂ O	ad 20 µl

Die Reaktionsansätze wurden für 1h bei 37°C inkubiert. Um Restriktionsenzyme und Puffer für nachfolgende Schritte zu entfernen, wurden die Ansätze in Anschluss mittels des *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen gereinigt.

3.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Damit DNA-Fragmente in einen Expressionsvektor mittels einer Ligation eingebracht werden können, ist es notwendig, die durch den Restriktionsverdau entstandenen 5'-Phosphate der vektoriellen DNA zu entfernen, um eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden. Dazu wurde in dieser Arbeit die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) verwendet. Die verwendeten Reagenzien stammten von der Firma Fermentas.

Reaktionsansatz

SAP	x U (s.u.)
SAP- Reaktionspuffer (10x)	5 µl
vektorielle DNA	0,5 µg

Die zu verwendende Menge SAP hängt von der molaren Konzentration freier 5'-Phosphate ab. Diese wurde nach der folgenden Formel berechnet. Pro picomol freier 5'-Enden wurde 1 Unit (U) SAP eingesetzt.

$$\text{Freie 5' Phosphate [pmol] pro } \mu\text{g vektorieller DNA} = \frac{2 \times 10^6}{600 \times \text{bp (Vektor)}}$$

Die Reaktionsansätze wurden für 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die SAP durch Inkubation bei 65°C für 15 min inaktiviert. Um Enzyme und Puffer für nachfolgende Schritte zu entfernen, wurden die Ansätze mit dem *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen gereinigt.

3.1.7 Ligation von PCR – Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Für die Ligationsreaktion wurde ein Insert : Vektor – Verhältnis von 3:1 verwendet. Die Konzentration von Vektor und Insert wurde nach Restriktionsverdau und Dephosphorylierung durch Messung der Absorption bei 260 nm am Nanodrop-Gerät ermittelt. Die verwendeten Reagenzien stammten von der Firma Fermentas.

Reaktionsansatz

T4 - Ligase	1 U
T4 – Ligationspuffer (10x)	3 µl
Insert-DNA	~ 150 ng
Vektor-DNA	~ 50 ng
ddH ₂ O	ad 30 µl

Die Reaktionsansätze wurden bis zu 48 h bei 22°C im PCR-Cycler inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in chemische kompetente *Escherichia coli* (Stamm XL1-blue) transformiert und auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert.

3.1.8 Plasmidpräparation in kleinem Maßstab (Mini-Präp)

Für die Plasmidpräparation in kleinem Maßstab, die im Anschluss an eine Ligation erfolgte, wurden chemisch kompetente *E. coli* des Stammes XL1-blue mit 5 µl des Ligationsansatzes transformiert und auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien von dieser Platte selektiert, in 2 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmide mittels des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab). Nach der Plasmidpräparation wurde ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt, um Plasmide, die das gewünschte Insert enthalten, zu identifizieren.

3.1.9 Plasmidpräparation in großem Maßstab (Maxi-Präp)

Für die Plasmidpräparation in großem Maßstab wurden Plasmide in chemisch kompetente *E. coli* des Stammes XL1-blue transformiert, in 200 ml LB - Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt und für 16h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung auf Reinigung der Plasmide mittels des HiSpeed Plasmid Maxi Kits (Qiagen). Die Konzentration der Plasmide wurde nach der Reinigung durch Messung der Absorption bei 260 nm am Lightwave 2 – Photometer (WPA) durchgeführt.

3.1.10 Herstellung von Deletionsmutanten

Die Herstellung von Deletionsmutanten erfolgte durch eine PCR mit geeigneten Primern (siehe 2.7.2). Zur Herstellung von C-terminalen Deletionsmutanten wurden in einer PCR nach Standardbedingungen (3.1.2) ein Hin-Primer, der am Start-Codon des jeweiligen Gens ansetzt zusammen mit Rück-Primern, die zu den gewünschten Endstellen komplementär

sind und zudem ein Stopp-Codon enthalten, eingesetzt. Die Herstellung N-terminaler Deletionsmutanten erfolgte analog, wobei der Rück-Primer das wildtypische Stopp-Codon beinhaltete und der Hin-Primer an den gewünschten Stellen im Gen ansetzte und zudem ein Start-Codon zu Expression enthielt.

3.1.11 Punktmutagenese mittels Quickchange

Eine Methode, gezielte Punktmutationen einzelner Codons in doppelsträngige DNA einzubringen, ist die sog. Quickchange-Mutagenese (Costa et al., 1996; Fisher and Pei, 1997). Bei dieser wird die Mutation durch Primer eingeführt, bei denen das gewünschten Ziel-Codon in 3' und 5' - Richtung von je 12-15 bp flankiert wird, die zur Ausgangs-DNA komplementär sind. Für die Quickchange-Mutagenese werden zwei Primer verwendet, die zu 100 % komplementär sind und dieselbe Stelle des kodierenden sowie des nicht-kodierenden Stranges binden.

Im ersten Schritt erfolgt eine PCR-Reaktion, bei der beide Stränge des zu mutierenden Plasmides vollständig repliziert werden. Daher ist es notwendig, eine Polymerase mit hoher Fehlergenauigkeit einzusetzen, wie z.B. die hier verwendete Pfu Ultra II – Polymerase (Stratagene).

Reaktionsansatz

Pfu Ultra II Polymerase (2,5 U/μl)	0,75 μl
Pfu Reaktionspuffer (10x)	5 μl
dNTP-Mix (10 mM each)	2 μl
Template-DNA	200 ng
Oligonukleotid-Primer	je 100 pmol
ddH ₂ O	ad 50μl

PCR-Parameter

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
Denaturierung vor dem 1. Zyklus	95°C	1 min.	1
Denaturierung	95°C	30 sec.	12
Hybridisierung	62°C	1 min.	
Elongation	72°C	1 min pro 1 kb	
Finale Elongation	72°C	5 min.	1

Im Gegensatz zu den ursprünglich in die Reaktion eingesetzten Parentalsträngen sind die neu entstandenen Plasmid-Stränge jedoch nicht vollständig geschlossen, da 3' und 5' - Ende nicht durch die Polymerase verknüpft werden können. Durch Paarung der Parentalstränge und der neu synthetisierten Stränge mit- und untereinander entstehen zum Abschluss der PCR-Reaktion doppelsträngige DNAs, die entweder nur die parentalen Stränge enthalten, eine Mischung aus neu synthetisierten und parentalen Strängen oder nur neu synthetisierte Stränge. Letztere Paarung entspricht dem gewünschten Plasmid, da hier in kodierenden und nicht-kodierendem Strang die durch die Primer eingeführte Mutation enthalten ist. Um diese Kombination spezifisch zu selektieren, wird ein Restriktionsverdau mit der aus *Diplococcus pneumoniae* isolierten Restriktionsendonuklease DpnI durchgeführt. Diese verdaut nur DNA, die methyliert oder hemi-methyliert ist. Da die DNA der Parentalstränge aus *E. coli* isoliert wurden, sind sie methyliert und dienen so als Erkennungstellen für DpnI, d.h. nur Doppelstränge, die diese Parentalstränge enthalten werden verdaut, während die doppelsträngige DNA, die nur aus neu synthetisierten Strängen besteht durch den Verdau geschützt ist. Die verwendeten Reagenzien stammten von der Firma Fermentas.

Reaktionsansatz

DpnI	10 U
Puffer Tango™ (10x)	6 µl
PCR - Ansatz	50 µl

Der Verdau mit DpnI erfolgte für 1h bei 37°C. Im Anschluss wurde das Enzym durch Inkubation bei 80°C für 20 min deaktiviert.

Im Anschluss an den Verdau wurde der PCR-Ansatz in chemisch kompetente *E.coli* des Stammes XL1-blue transformiert (3.2.3) und anschließend auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert. Dies dient dazu, die gewünschten Plasmide zu amplifizieren, zudem werden die noch in den Plasmiden vorhandenen Lücken in den Plasmiden durch *E. coli* geschlossen. Der Erfolg der Mutagenese wird im Anschluss durch Selektion einzelner Klone mit anschließender Plasmidpräparation in kleinem Maßstab (3.1.8) und Sequenzierung der Plasmide überprüft.

3.2 mikrobiologische Methoden

3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurde der Stamm XL1-blue verwendet. Dazu wurden 3 ml LB-Medium ohne Selektionsantibiotika mit den entsprechenden Bakterien inokkuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB Medium ohne Selektionsantibiotika mit 0,5 ml dieser Über-Nacht Kultur angeimpft, bei 24°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert und im Anschluss mittels des Z-competent *E. coli* Transform Kit (Zymo Research) chemisch kompetent gemacht. Die kompetenten Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

3.2.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurde der Stamm BL21-Rosetta verwendet. Dazu wurden 10 ml LB Medium mit Chloramphenicol (Endkonzentration 34µg/ml) versetzt, mit 100 µl eines BL21-Rosetta Glyzerin-Stocks inokkuliert und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurden am darauf folgenden Tag 1 l LB Medium mit Chloramphenicol (Endkonzentration 34µg/ml) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde anschließend 15 min auf Eis gekühlt, bei 4000 rpm und 4°C für 15 min abzentrifugiert und 3 mal mit je 1l eiskaltem ddH₂O gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Bakterienpellet in 20 ml eiskaltem ddH₂O mit 10 % Glyzerin resuspendiert, erneut abzentrifugiert, in 2 ml ddH₂O mit 10% Glyzerin aufgenommen und in Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt. Die Aliquots wurden anschließend für 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* wurde diese auf Eis aufgetaut, mit 25 µl eines Ligationsansatzes oder 0,5 – 1 µg Minipräp-DNA versetzt und bei für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB – Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und für 16 h bei 37°C inkubiert.

3.2.4 Transformation elektrokompetenter *E. coli*

Zur Transformation elektrokompetenter *E. coli* des Stammes BL21-Rosetta wurden Glyzerin-Stocks auf Eis aufgetaut, mit 1 µg Plasmid-DNA versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert.

Danach wurden die Bakterien in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,2 cm) überführt und mittels des Gene Pulser Elektroporators (Biorad) bei 2,5 kV, 25µF und 200 Ohm elektroporiert. Im Anschluss wurden die Bakterien sofort in 1ml LB Medium ohne Selektionsantibiotika überführt und für 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml LB Medium mit Chloramphenicol (Endkonzentration 34 µg / ml) und weiteren entsprechenden Selektionsantibiotika angeimpft und für 5-6 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Aus dieser Kultur wurden Glyzerin-Stocks hergestellt (3.2.2).

3.3 Zellkulturtechniken

3.3.1 Kultur von eukaryotischen Zellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Säugerzelllinien handelt es sich um die aus menschlichen embryonalen Nierenzellen isolierten, mit dem SV40 Large T-Antigen transformierten HEK (Human Embryonal Kidney) 293T – Zellen (siehe 2.12), sowie um die aus einem humanem Lebertumor gewonnene Zelllinie HuH-7 (Human Hepatoma cell line 7, siehe 2.12). Beide Zelllinien wurden an einer sterilen Werkbank passagiert und bei 37°C, 5% CO₂ und 80% Luftfeuchtigkeit in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, dem 10 % fötales Kälberserum sowie Penicillin (Enkonzentration 100 U / ml), Streptomycin (Endkonzentration 100 µg/ml) und L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM) zugesetzt waren.

Die Zellen wurden passagiert, sobald der Zellrasen zur Konfluenz angewachsen war. Dazu wurde der alte Zellüberstand verworfen und die Zellen zweimal mit auf 37°C vorgewärmtem, sterilem PBS_{def} gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin mit 3 ml Trypsin/EDTA versetzt und für 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Sobald sich alle Zellen vom Boden der Flasche abgelöst haben, wurden sie durch Zugabe von 7 ml frischem Medium resuspendiert und 1/10 der Zellsuspension in eine neue Flasche mit 19 ml frischem Medium überführt. Die Zellen wurden danach im Brutschrank bis zur Konfluenz inkubiert.

3.3.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels TurboFect™ und Lipofectamine™ 2000

Bei Turbofect™ handelt es sich um ein kationisches Polymer, das in der Lage ist, zusammen mit DNA einen Komplex zu bilden, welcher von Säugerzellen aufgenommen wird.

Dadurch findet ein Transfer der DNA ins Innere der Zellen statt. Analog dazu kann Lipofectamine™ 2000 zusammen mit DNA Liposomen bilden, welche ebenfalls von Säugerzellen aufgenommen werden können. Für die Transfektion von Säugerzellen mit

Turbofect™ und Lipofectamine™ 2000 wurden die Zellen am Vortag in 6 cm – Schalen bzw. im 24 well auf Deckgläschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion nach Angaben des Herstellers (Thermo Fischer bzw. Invitrogen), wobei im Falle von Turbofect™ pro 1 µg DNA 2 µl Turbofect™ verwendet wurde, während für die Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000 pro 1 µg DNA 1 µg Lipofectamine™ 2000 eingesetzt wurde.

3.4 proteinbiochemische Methoden

3.4.1 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Lämmli (Lämmli, 1970) ermöglicht es, Proteine selektiv nach ihrer scheinbaren Größe aufzutrennen. Dazu werden die Proteine denaturiert, indem sie in Anwesenheit von SDS und β-Mercaptoethanol aufgekocht werden. So wird gewährleistet, dass das Laufverhalten der Proteine allein von ihrer Größe und nicht von ihrer Form abhängt. Das SDS verleiht den Proteinen zusätzlich eine negative Ladung, so dass sie im Spannungsfeld durch das Polyacrylamid-Gel entsprechend ihrer Größe zur positiv geladenen Anode wandern. Die Proteine können dann nach der Elektrophorese durch Elektrottransfer auf eine Nitrocellulosemembran (3.4.2) oder Färbung mittels Coomassie (3.4.4) detektiert werden.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden Minigele mit 6 cm x 8 cm (Systeme der Firma Keutz) nach folgenden Rezepten hergestellt (Angaben für 2 Minigele):

<u>Trenngel</u>	<u>10 %</u>	<u>12 %</u>	<u>15 %</u>	<u>Sammelgel</u>	<u>4 %</u>
ddH ₂ O	3,9 ml	3,3 ml	2,6 ml	ddH ₂ O	2,9 ml
1,5 M Tris, 0,4 % SDS pH 8,8	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8	1,3 ml
30 % Acrylamid	3,4 ml	4,0 ml	5,0 ml	30 % Acrylamid	0,75 ml
10 % APS	55 µl	55 µl	55 µl	10 % APS	55 µl
TEMED	12 µl	12 µl	12 µl	TEMED	12 µl

Zur Herstellung von 2-Phasen Gelen (10 und 15 %) wurde zuerst ein 15%iges Trenngel halber Höhe gegossen. Nachdem dieses polymerisiert war, wurde es mit einem 10%igem Trenngel halber Höhe überschichtet und nach dessen Polymerisation abschließend mit dem Sammelgel überschichtet.

3.4.2 Elektrotransfer auf Nitrocellulosemembranen (Western Blot)

Um Proteine nach der Auftrennung in einem SDS-Gel zu detektieren, können diese mittels Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Dies ist möglich, da den Proteinen durch das SDS eine negative Ladung verliehen wird, durch welche diese im elektrischen Feld aus dem Polyacrylamidgel in Richtung der positiv geladenen Anode auf die Nitrozellulosemembran transferiert werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Semi-Dry Blot Verfahren wurde dazu das Gel auf die Membran gelegt und zusammen mit Filterpapieren, die in Westernblot-Transferpuffer getränkte waren, zwischen zwei Kohle-Elektroden positioniert. Der Elektrotransfer wurde dann bei $0,8 \text{ mA} / \text{cm}^2$ für 1 h durchgeführt.

3.4.3 Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

Nach dem Elektrotransfer können die auf der Nitrozellulosemembran kovalent gebundenen Proteine mittels Antikörpern detektiert werden. Dazu wurden zuerst die noch freien Bindestellen auf der Membran durch Inkubation für 30 min in 7% Milchpulverlösung (w/v) in PBS_{def} abgesättigt. Anschließend wurde der entsprechende Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 hinzugefügt, mit der Membran für 60 min unter Schütteln inkubiert und dreimal mit PBS_{def} gewaschen. Der Nachweis des Primärantikörpers erfolgte daraufhin mit einem gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper, an den ein Fluochrom zur Detektion gekoppelt ist. Die Membran wurde dazu mit diesem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 7% Milchpulverlösung (w/v) in PBS_{def} für 60 min unter Schütteln inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS_{def} wurden die Proteine mittels des Odyssey Infrarot-Detektionssystems detektiert.

3.4.4 Nachweis von Proteinen durch Coomassie-Färbung

Zum Nachweis von Proteinen im SDS-Gel wurde das Gel über Nacht in Coomassie G-250 Lösung (2.13.1) inkubiert. Dabei lagert sich der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau an die basischen Reste der Aminosäuren an und färbt so alle im Gel aufgetrennten Proteine. Am folgenden Tag wurde das Gel zweimal kurz mit ddH_2O gewaschen und anschließend so lange in Entfärberlösung (2.13.1) inkubiert, bis ein klarer Gelhintergrund zu erkennen war. Die Proteine wurden dann mit dem Odyssey Infrarot Detektionssystem visualisiert.

3.4.5 Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation

Die Zentrifugation durch einen Rohrzuckergradienten ist eine Methode, um die Größe von Proteinen oder Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen zu untersuchen. Dabei ist das Laufverhalten der Proteine im Gradienten abhängig von ihrer Größe, so dass durch den Vergleich mit dem Laufverhalten definierter Markerproteine ihr Molekulargewicht bestimmt werden kann.

Für die Herstellung der Gradienten wurde ein Gradientenmischer verwendet. Dazu wurden kontinuierliche Gradienten von 0 – 8 % (w/w) bzw. 5 – 35 % (w/w) Rohrzuckerlösung vorbereitet und mit 200 µl Proteinlösung überschichtet. Für jeden Gradienten wurde ein weiterer Gradient gleicher Konzentration gegossen und mit entsprechenden Markerproteinen überschichtet. Anschließend erfolgte die Ultrazentrifugation im SW60 – Rotor bei 165.000 x g und 4°C für 18 h. Im Anschluss wurde der Gradient in 200µl - Fraktionen von oben her abgetragen, eine Probe jeder Fraktion mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Western Blot oder Coomassie-Färbung auf ihre Proteinzusammensetzung hin untersucht.

3.4.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden HuH7 – Zellen verwendet, da sich diese aufgrund ihrer Größe für Immunfluoreszenz besonders gut eignen. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, bis zu einer Konfluenz von 80% im Brutschrank inkubiert und anschließend mittels Lipofectamine™ 2000 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Medium entfernt, die Zellen 3 mal mit PBS++ gewaschen und durch die Zugabe von 4 % (w/v) Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach 3maligem Waschen mit PBS++ erfolgte die Permeabilisierung durch 5-minütige Inkubation mit 0,2 % (v/v) Triton X-100 bei RT. Dieser Schritt ermöglicht es den verwendeten Antikörpern ins Zellinnere zu gelangen, wodurch auch zytoplasmatische oder kernlokalisierte Proteine detektiert werden können. Um unspezifische Bindestellen abzusättigen, wurden die Zellen nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS++ für 5 min in 1% (w/v) BSA (Bovines Serumalbumin)-Lösung auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT mit den entsprechenden Primärantikörpern (Verdünnung 1:100 in PBS++) inkubiert. Um die Zellkerne anzufärben, war der Antikörperlösung zusätzlich der Farbstoff DAPI (Verdünnung 1:1000) zugesetzt. Nach der Inkubation und 3 maligem Waschen in PBS++ erfolgte die Detektion der Primärantikörper durch die Inkubation mit entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (Verdünnung 1:100 in PBS++) für 1 h bei RT. Abschließend wurden die Zellen je 3 mal in PBS++ und ddH₂O gewaschen, in Mowiol 4-88

auf einem Objektträger eingebettet und mittels eines Zeiss Axiovert200M Mikroskops ausgewertet.

3.4.7 Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation ist eine Methode, um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* zu detektieren. Dabei wird die Interaktion über die Immun-Fällung eines der beiden Bindungspartner durch einen spezifischen Antikörper und Protein A – Sepharose nachgewiesen. Wenn der zweite Bindungspartner dabei ko-präzipitiert, so liegt eine direkte oder indirekte Interaktion beider Partner vor.

Für die Ko-Immunpräzipitation wurden HEK293T-Zellen in 6 cm – Schalen bis zu einer Konfluenz von 80% im Brutschrank inkubiert und mittels TurboFect™ transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen dreimal mit PBS_{def} gewaschen und in COIP-Puffer (2.13.1) resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin lysiert, indem sie mehrfach durch eine dünne Kanüle gezogen und anschließend für insgesamt 90 sec. bei 40 W im Schallkonus sonifiziert wurden. Dieses Zelllysate wurde dann durch Zentrifugation bei 21.000 x g für 20 min bei 4°C vorgeklärt und der Überstand mit einem spezifischen Antikörper (Verdünnung 1:1000) gegen einen der beiden Bindungspartner versetzt. Die Bindung des Antikörpers erfolgte dabei durch Inkubation für 30 min bei RT auf einem Drehrad. Anschließend wurden dem Ansatz 0,003 mg Protein A – Sepharose in COIP-Puffer zugefügt und für 1 h bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Protein A – Sepharose nach Ablauf der Inkubation insgesamt 6 mal durch Abzentrifugieren bei 1000 x g für 2 min und anschließendes Resuspendieren in COIP – Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Protein A – Sepharose in 4 x SDS - Probenpuffer aufgenommen und die präzipitierten Proteine durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Für die quantitative Auswertung wurden einzelne Proteinbanden mittels der Odyssey-Software quantifiziert. Um eventuelle Unterschiede in den Expressionsleveln einzelner Proteine in Betracht zu ziehen, wurden zudem die entsprechenden Bandenintensitäten im Zelllysate gemessen, verglichen und gegen die Bandenintensität der Ladekontrolle Tubulin genormt. So wurde ein Korrekturfaktor ermittelt, welcher in die Berechnung der quantitativen Unterschiede zwischen den Proteinbanden Ko-Immunpräzipitierter Proteine einbezogen wurde.

3.4.8 Herstellung und Reinigung virusähnlicher Partikel

Die Matrixproteine einiger Viren sind in der Lage, bei Einzelexpression in eukaryotischen Zellen virusähnliche Partikel (VLPs) auszubilden. Das Matrixprotein kleidet dabei die innere

Hülle der VLPs aus und ist die treibend Kraft bei der Freisetzung und Abschnürung dieser Partikel. Sie stimmen daher oftmals in Größe und Form mit den authentischen Viren überein. Auch das Z-Protein des Lassavirus hat die Fähigkeit VLPs zu bilden (1.3.2).

Für die Herstellung und Isolation von Z-induzierten VLPs wurden HEK293T-Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm ausgesät und mittels TurboFect™ transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und durch niedertourige Zentrifugation bei 4600 x g für 10 min von abgelösten Zellen und Zellresten getrennt. Der Überstand wurde daraufhin in ein SW60 - Ultrazentrifugenröhrchen überführt, mit 500µl einer 20%igen (w/v) Rohrzuckerlösung in PBS_{def} unterschichtet und für 1,5 h bei 300.000 x g zentrifugiert (Schlie et al., 2010a; Strecker et al., 2003). Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand vorsichtig verworfen und das Pellet, in dem sich nun die VLPs befinden in PBS_{def} resuspendiert. Die resuspendierten VLPs wurden anschließend einem Protease-Protektionsversuch (3.4.9) unterzogen oder mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht.

3.4.9 Protease - Protektionsversuch

Um zu überprüfen, ob sich die nach einer VLP-Aufreinigung detektierten Proteine auch innerhalb der lipidumhüllten Partikel befinden, wurde ein Protease - Protektionsversuch durchgeführt. Dazu wurden die VLPs in drei Fraktionen aufgeteilt. Fraktion eins blieb unbehandelt, Fraktion zwei wurde mit einer Protease versetzt und Fraktion drei wurde mit Protease in Anwesenheit von Detergenz behandelt. Nur diejenigen Proteine, die sich innerhalb der Vesikel befinden sind dabei durch die Lipidhülle vor dem Verdau geschützt, während nach der Zugabe von Detergenz alle Proteine verdaut werden.

Der Protease – Protektionsversuch wurde nach der Methode von Lenz et al (Lenz et al., 2001) durchgeführt. Gereinigte VLPs wurden mit PBS_{def}, Proteinase K (Endkonzentration 10 U / µl) oder Proteinase K plus 1% (v/v) Triton X-100 versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Um die Proteinase K zu inaktivieren, wurde dem Ansatz nach Ablauf der Inkubationszeit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, gelöst in DMSO, Endkonzentration 4 mM) zugesetzt. Anschließend wurden die Ansätze mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.4.10 Expression von MBP-Fusionsproteinen in *Escherichia coli*

Die Expression in *E. coli* stellt eine effektive Methode dar, große Mengen eines gewünschten Proteins zu produzieren und zu reinigen. Im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen fehlen in *E. coli* jedoch zahlreiche posttranslationale Modifikationen und Chaperon-Systeme, die im

eukaryotischen Expressionssystem zur Verfügung stehen. Daher kommt es oftmals zur Fehlfaltung des Proteins, was in der Bildung von sog. Einschlusskörperchen resultiert und die Reinigung erheblich erschwert oder gänzlich verhindert. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die Expression eines Fusionsproteins. Ein solcher Fusionspartner, der dafür bekannt ist, die Löslichkeit des gewünschten Proteins zu erhöhen, ist das Maltose-Bindungsprotein (MBP) (Fox and Waugh, 2003).

Zur Expression eines MBP-Fusionsproteins wurde das gewünschte Gen in die multiple cloning site (MCS) des Vektors pMalc2g kloniert und *E. coli* des Stammes BL21-Rosetta mit dem jeweiligen Plasmid mittels Elektroporation (3.2.4) transformiert. Dieser Ansatz wurde mit Glyzin (Endkonzentration 20%) versetzt und bei -80°C aufbewahrt. Für die Expression wurden Aliquots dieser *E.coli*-Stammlösung aufgetaut und in 1l Rich Broth Medium, das mit Ampicilin (Endkonzentration 100 µg / ml) sowie Glukose (Endkonzentration 10 mM) versetzt war, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Expression des gewünschten Proteins durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,03 mM) induziert. Die Bakterien wurden daraufhin für 16 h bei 25°C im temperierten Schüttler inkubiert, am nächsten Tag abzentrifugiert und das Bakterienpellet entweder für die Aufreinigung der Proteine lysiert (3.4.11) oder für die spätere Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.4.11 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie

Eine Möglichkeit, einzelne Proteine aus Bakterienlysaten zu isolieren, ist die Affinitätschromatographie. Dabei wird das entsprechende Protein auf Genebene mit einem sog. Affinitätstag versehen, welcher als reversibler Interaktionspartner für z.B. bestimmte Metallionen oder spezifische Proteine dienen kann. Im Falle von MBP-Fusionsproteinen erfolgt die Fällung über die Interaktion des Maltose-Bindungsproteins mit Amylose, welche kovalent an eine Agarose-Matrix gebunden ist. Zusammen mit der Agarose kann das Fusionsprotein dann aus einem Zelllysat isoliert werden und durch Zugabe von freier Maltose anschließend wieder von der Agarose eluiert werden.

Für die Reinigung von MBP-Fusionsproteinen wurde das Bakterienpellet (3.4.10) in TNE-Puffer, dem *Complete*TM *Protease-Inhibitor* (Roche) zugesetzt war, resuspendiert und durch 6 Pulse zu je 15 s und 40W im Schallkonus lysiert. Unlösliche Bestandteile wurden danach durch Zentrifugation für 30 min bei 35.000 x g abgetrennt, der Überstand mit 6 ml Amylose-Matrix (0,8 mg / ml, New England Biolabs), versetzt und für 16 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach der Inkubation wurde der gesamte Ansatz in eine Säule mit Filterstopfen überführt und die flüssige Phase von der festen Phase getrennt. Anschließend wurde die Amylose-Matrix mit 10 Säulenvolumen TNE-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von TNE-Puffer + 10 mM Maltose in 10 Schritten zu je einem

Säulenvolumen. Jede einzelne Fraktion wurde separat gesammelt, eine Probe davon mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und auf das Vorhandensein des gewünschten Proteins und den Reinheitsgrad mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

3.4.12 Spaltung von MBP-Fusionsproteinen

Die Expression von Proteinen als MBP-Fusionsprotein erhöht zwar in vielen Fällen die Löslichkeit des jeweiligen Proteins, doch kann das MBP als Fusionspartner bei späteren Analysen wie Aktivitätsmessungen von Enzymen oder Kristallisationsversuchen stören. Daher ist es notwendig, das MBP vom gewünschten Protein zu trennen. Zu diesem Zweck befindet sich zwischen dem MBP und dem Fusionspartner eine Protease-Schnittstelle. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten System handelte es sich dabei um die Erkennungssequenz (PGAAHY) der GenenaseTM I (Carter and Wells, 1987). Um MBP und Zielprotein zu trennen, wurde dabei die Konzentration des Zielproteins in einzelnen Fraktionen nach der Affinitätschromatographie (3.4.12) durch den Vergleich mit einem BSA-Proteinstandard ermittelt. Pro 1 mg Protein wurde den Fraktionen dann 0,02 mg GenenaseTM I (New England Biolabs) zugefügt. Die Ansätze wurden für 16 h bei RT auf einem Drehrad inkubiert und die Spaltungseffizienz am nächsten Tag durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

3.4.13 Gelfiltrationschromatographie mittels ÄKTA-FPLC

Die Gelfiltrationschromatographie ermöglicht es, Proteine unter nativen Bedingungen ihrer Größe nach zu trennen. Dabei befinden sich die Proteine in der flüssigen Phase und werden durch eine poröse Matrix mit definierter Porengröße geleitet. Die kleineren Proteine können dabei in die Matrix eindringen und wandern so langsamer, da sie eine größere Strecke zurücklegen müssen, während größere Proteine lediglich mit der mobilen Phase wandern und folglich die Matrix eher verlassen.

Für die Gelfiltration mittels East protein liquid chromatography (FPLC) wurde eine Superdex 200 HR 10/60 - Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) in Verbindung mit einem ÄKTA-FPLC System (GE Healthcare) verwendet. Die Säule wurde dazu vorher mit 1,5 Säulenvolumen des entsprechenden Puffers equilibriert. Die Proben wurden durch Centricon – Röhrchen (Millipore) mit geeignetem molekularen Cut-Off auf ein Volumen von max. 500 µl ankonzentriert und anschließend bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml / min auf die Säule geladen. Der Durchfluss wurde in Fraktionen zu je 500 µl gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Um das jeweilige Elutionsvolumen einem Molekulargewicht zuzuordnen, wurde nach obigem Protokoll ein separater Lauf mit geeigneten Markerproteinen (GE Healthcare) durchgeführt, die Elutionsvolumina der einzelnen Proteine im Verhältnis zum Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichts in einem Graphen aufgetragen und eine Ausgleichsgerade durch die Messpunkte ermittelt. Die Steigungsgleichung dieser Gerade ermöglicht es dann, jedem Elutionsvolumen ein zugehöriges Molekulargewicht zuzuordnen.

3.4.14 Vorbereitung von Proben für Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden Kupfer-Netzen, welche einseitig mit Kohlenstoff beschichtet waren mit einer dünnen Schicht (Dicke ca. 75 nm) aus einer frischen 0,4%igen (w/v) Polyvinylformal (Formvar) /Chloroform-Lösung bedeckt. Die in flüssiger Lösung vorliegenden Proben wurden dann auf die Netzen aufgebracht und für 1-10 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben durch Inkubation in 0,75 % Uranylacetat negativ kontrastiert, getrocknet und mittels eines Zeiss 109 Elektronenmikroskops bei 100.000 facher Vergrößerung untersucht.

3.4.15 Interferon β - Induktionsnachweis

Der Interferon β – Induktionsnachweis basiert auf einem Vektor, in welchem eine Luciferase unter Kontrolle des spezifischen Promotors für Interferon β steht. Werden Zellen, die mit diesem Plasmid transfiziert sind durch verschiedene Induktoren, wie z.B. doppelsträngiger, viraler RNA zur Bildung von Interferon angeregt, so kommt es aufgrund der Aktivierung des Interferon β – Promotors zur Expression der Luciferase.

Durch Messung der Luciferase-Aktivität kann nun indirekt auf die Induktion dieses Interferon-spezifischen Promotors zurückgeschlossen werden. Durch gleichzeitige Expression eines Proteins kann dann überprüft werden, ob dieses Protein in der Lage ist, die Aktivierung der Interferon β -Produktion zu inhibieren.

Für die Messung des Einflusses verschiedener Proteine auf die zelluläre Interferon-Antwort wurden HEK293FR-Zellen mit einem Plasmid, welches für die ursprünglich aus *Photinus pyralis* isolierte *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle des Interferon β -Promotors kodiert (p-125luc, (Yoneyama et al., 1996)) zusammen mit Konstrukten für verschiedene zu testende Proteine transfiziert. Zur Normalisierung der erhaltenen Signale wurde jedem Transfektionsansatz ein Konstrukt zugefügt, das für die ursprünglich aus der Oktokoralle *Renilla reniformis* isolierte *Renilla*-Luciferase kodiert (pCAGGS-HR-Luc). 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit viraler RNA des vesikulären Stomatitis Virus (VSV) transfiziert. Da diese RNA als starker Induktor der Interferon-Antwort gilt, wird durch die

vRNA des VSV auch die Expression der durch den pi125luc-Vektor kodierten *Firefly*-Luciferase induziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der *Renilla*- und *Firefly*-Luciferase mittels eines Centro LB 960 Luminometers (Berthold Technologies) gemessen.

3.4.16 Messungen mit dem Lassavirus Replicon-System

Das Lassavirus Replicon-System ermöglicht es, die Funktionalität der für die Replikation und Transkription des viralen Genoms benötigten viralen Proteine sowie die regulatorischen Elemente innerhalb des Lassavirus-Genoms in einem Virus-freien Kontext zu untersuchen.

Das System selbst basiert auf dem sog. Minigenom (Hass et al., 2004). Bei diesem handelt es sich um ein modifiziertes genomisches S-Segment des Lassavirus-Stammes AV, das alle regulatorischen Elemente für die Transkription und Replikation enthält, während die Gene für das Nukleoprotein und das Glykoprotein deletiert wurden. Anstelle des offenen Leserahmens für das Nukleoprotein kodiert das Minigenom für ein Reportergen, die *Renilla*-Luciferase, welches unter Kontrolle des T7 Promotors steht (siehe Anhang A5). Das Minigenom selbst ist plasmidkodiert und wird *in vitro* durch die T7-Polymerase zellfrei transkribiert. Die offenen Leserahmen für die virale Polymerase L sowie das Nukleoprotein NP werden durch den Vektor pCITE2/4 kodiert (siehe 2.8 und Anhang A5), wo sie wie auch das Minigenom unter Kontrolle des T7-Promotors stehen. Werden die entsprechenden Konstrukte für NP und L zusammen mit dem *in vitro* transkribiertem Minigenom transfiziert, finden Transkription und Replikation des Minigenoms statt. Dadurch kommt es zur Translation der *Renilla*-Luciferase, dessen Aktivität ein Maß für Replikation und Transkription darstellt.

Für die Messung verschiedener Nukleoprotein-Mutanten im Replicon-System wurden BSR-T7/5 - Zellen (siehe 2.12) verwendet. Diese exprimieren stabil die T7-Polymerase, was die Expression der entsprechenden Proteine sowie die Transkription des Minigenoms ermöglicht. Die Zellen wurden mit einem *in vitro* transkribiertem *run-off* Transkript des Minigenoms transfiziert. Zusammen mit diesem wurde ein PCR-Produkt, das für die virale Polymerase L sowie Plasmide, die für das Nukleoprotein bzw. die entsprechenden Nukleoprotein-Mutanten kodieren, ko-transfiziert. Zur Normalisierung wurde jedem Transfektionsansatz ein Plasmid zugefügt, das für die *Firefly*-Luciferase kodiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase gemessen.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Oligomerisierung von prokaryotisch und eukaryotisch exprimiertem Nukleoprotein

Da über die Struktur des Nukleoproteins (NP) der Arenaviren, speziell über das Nukleoprotein des Lassavirus, zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt war, wurde das NP des Lassavirus in einem ersten Ansatz hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Oligomerisierung und der Ultrastruktur evtl. Oligomere untersucht. Dazu wurde das NP des Lassavirus bei Expression in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen charakterisiert, um so einen Vergleich zwischen den intrinsischen Eigenschaften des NP und dem Einfluss evtl. vorhandener posttranslationaler Modifikationen in Säugerzellen zu erhalten. Da es sich bei Säugerzellen um die natürlichen Wirtszellen des LASV handelt, wären Ergebnisse für das NP aus diesen Zellen näher an der natürlichen Situation während einer Virusinfektion als bakteriell exprimiertes NP.

4.1.1 Expression des Lassavirus Nukleoproteins in *Escherichia coli*

Zur näheren Charakterisierung wurde das NP in *Escherichia coli* exprimiert. Frühere Versuche zeigten, dass das native NP bei Expression in *E.coli* als unlösliche Form vorliegt und in Einschlusskörperchen in den Bakterien aggregiert (*Oliver Lenz, persönliche Mitteilung*).

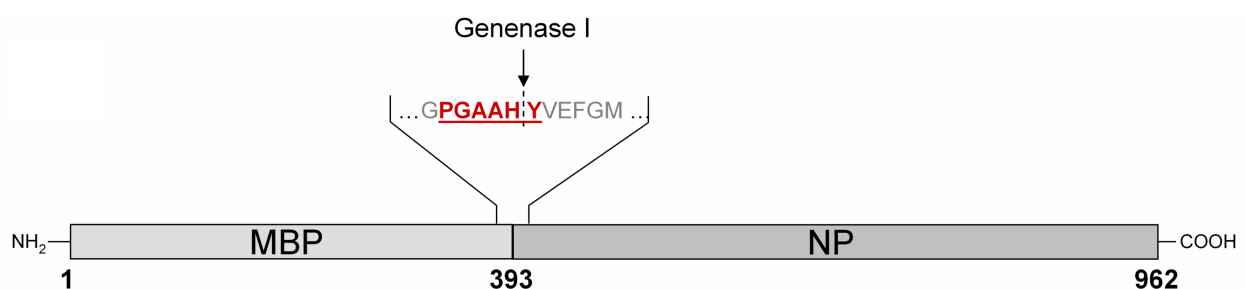


Abb. 11: Schematische Darstellung des in *E.coli* exprimierten Fusionsproteins

Das Maltose-Bindungsprotein (MBP) wurde auf Genebene N-terminal an das Nukleoprotein (NP) fusioniert. Gezeigt sind zudem die zwischen MBP und NP liegenden Aminosäuren der Genase I - Spaltstelle (rot) und flankierende weitere Aminosäuren (grau). Die Spaltstelle ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Aus diesem Grund wurde es als Fusionsprotein aus dem NP und dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) exprimiert werden (Abb. 11), da das MBP dafür bekannt ist, die Löslichkeit prokaryotisch exprimierter Proteine zu erhöhen (Fox and Waugh, 2003). Zur

4. Ergebnisse

Expression dieses Fusionsproteins wurde der *E.coli* – Stamm BL21-Rosetta verwendet, der ein zusätzliches Plasmid trägt, über welches tRNAs für in Bakterien selten verwendete Codons zur Verfügung gestellt werden (siehe 2.11). Durch dieses Plasmid wird die unterschiedliche Codonnutzung (*Codon Bias*, (Grantham et al., 1980)) zwischen Bakterien und Säugerzellen kompensiert. Die Verwendung dieser speziellen Bakterien war notwendig, da das MBP-NP Fusionsprotein nicht in BL21-Bakterien exprimiert wurde (*Daten nicht gezeigt*).

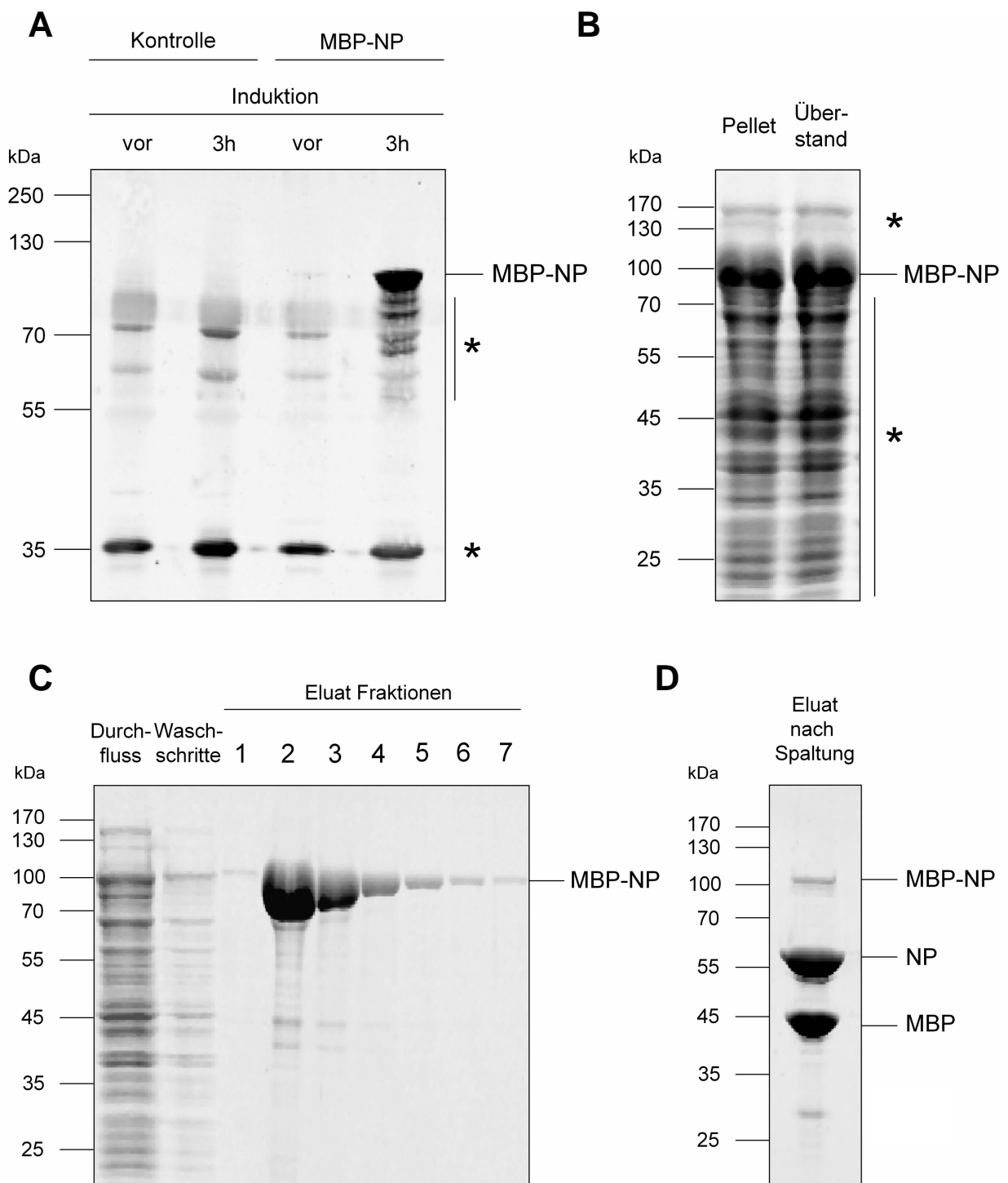


Abb. 12: Expression und Reinigung des MBP-NP Fusionsproteins

(A) *E. coli* BL21-Rosetta, die MBP-NP stabil exprimieren, wurden bis zu einer OD von 0,5 inkubiert und danach durch Zugabe von 0,03 mM IPTG induziert. Vor und 3h nach Induktion wurden 1 ml der Bakteriensuspension zentrifugiert, gewaschen, in 4x Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot unter Verwendung eines α -NP Antikörpers analysiert. Sterne markieren unspezifische Produkte. **(B)** *E. coli* BL21-Rosetta, die MBP-NP stabil exprimieren, wurden mit 0,03 mM IPTG induziert, 16h bei 20°C inkubiert und am nächsten Tag gewaschen und lysiert. Der lösliche Überstand wurde durch Ultrazentrifugation abgetrennt und eine Probe davon wurde in 4x Probenpuffer aufgenommen. Das Zellpellet wurde in PBS_{def} resuspendiert und mit 4x Probenpuffer versetzt. Überstand und Zellpellet wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Sterne markieren unspezifische Produkte. **(C)** 1 Liter einer Kultur von *E. coli* BL21-Rosetta, die MBP-NP stabil exprimieren, wurde mit 0,03 mM IPTG induziert, 16h bei 20 °C inkubiert und am nächsten Tag zentrifugiert, gewaschen und lysiert. Der lösliche Überstand wurde für eine Affinitätschromatographie mit 10 ml in TNE-Puffer prä-equilibrierter Amylose-Matrix (0,8g Amylose-Matrix / ml) verwendet. Die Fraktionen der einzelnen Waschschrte wurden vereinigt. Die Elution des MBP-NP erfolgte in sieben Schritten durch Zugabe von jeweils 1 ml einer 10mM Maltose-Lösung. Aliquots des Durchflusses und der einzelnen Elutionsschritte wurden mit 4x Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. **(D)** Die Konzentration von MBP-NP in den Elutionsfraktionen 2-4 nach Affinitätschromatographie wurde durch den Vergleich mit einem BSA-Standard ermittelt. Die einzelnen Fraktionen wurden daraufhin mit Genenase I versetzt (0,02 mg Genenase I / mg MBP-NP) und für 16h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Spaltungseffizienz mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Repräsentativ gezeigt ist die Spaltung der Fraktion 2 aus (C).

Das MBP-NP Fusionsprotein wurde im *E. coli* Stamm BL21-Rosetta nach Induktion der Proteinexpression exprimiert (Abb. 12A). Das Molekulargewicht dieses Proteins liegt bei ca. 105 kDa, und entspricht damit dem errechneten Molekulargewicht von 106 kDa (NP = 64 kDa, MBP = 42 kDa). Das Fusionsprotein war im Gegensatz zu nativen NP löslich und konnte nach Abtrennung unlöslicher Bestandteile im Überstand lysierter *E. coli* nachgewiesen werden (Abb. 12B). Aus diesem Grund wurde 1 Liter einer Kultur von *E. coli* BL21-Rosetta, welche das MBP-NP Fusionsprotein stabil exprimieren, bei einer OD von 0,5 induziert, 16 h bei 20°C inkubiert und anschließend lysiert. Nach Vorklärung des Überstandes wurde das MBP-NP-Fusionsprotein durch Affinitätschromatographie über eine Amylose-Matrix gereinigt. Dabei lies sich nur wenig MBP-NP in Durchfluss und Waschschrten finden, während der Hauptteil des Fusionsproteins bei der Elution von der Amylose-Matrix in den Fraktionen 2 und 3 nachgewiesen werden konnte (Abb. 12C). Das derart gereinigte Fusionsprotein wies zudem bereits einen Reinheitsgrad von ca. 90% auf.

Das Ziel war es, das NP näher zu charakterisieren. Dazu war es notwendig, das NP vom MBP-Anteil des Fusionsproteins zu trennen. Die Elutionsfraktionen 2 bis 4 (Abb. 12C) wurden daher mit der Endopeptidase Genenase I versetzt. Dieses Enzym schneidet Proteine

zwischen dem Histidin- und dem Tyrosin-Rest an der spezifischen Aminosäuresequenz (PGA^H↓Y), die sich im Falle des Fusionsproteins zwischen dem MBP und dem NP befindet (Abb. 11). Nach Inkubation mit Genenase I waren ca. 95 % des Fusionsproteins in einen MBP- und einen NP-Anteil gespalten (Abb. 12D). Mittels Massenspektrometrie wurde bestätigt, dass es sich bei der Proteinbande auf Höhe von ca. 60 kDa um NP handelt.

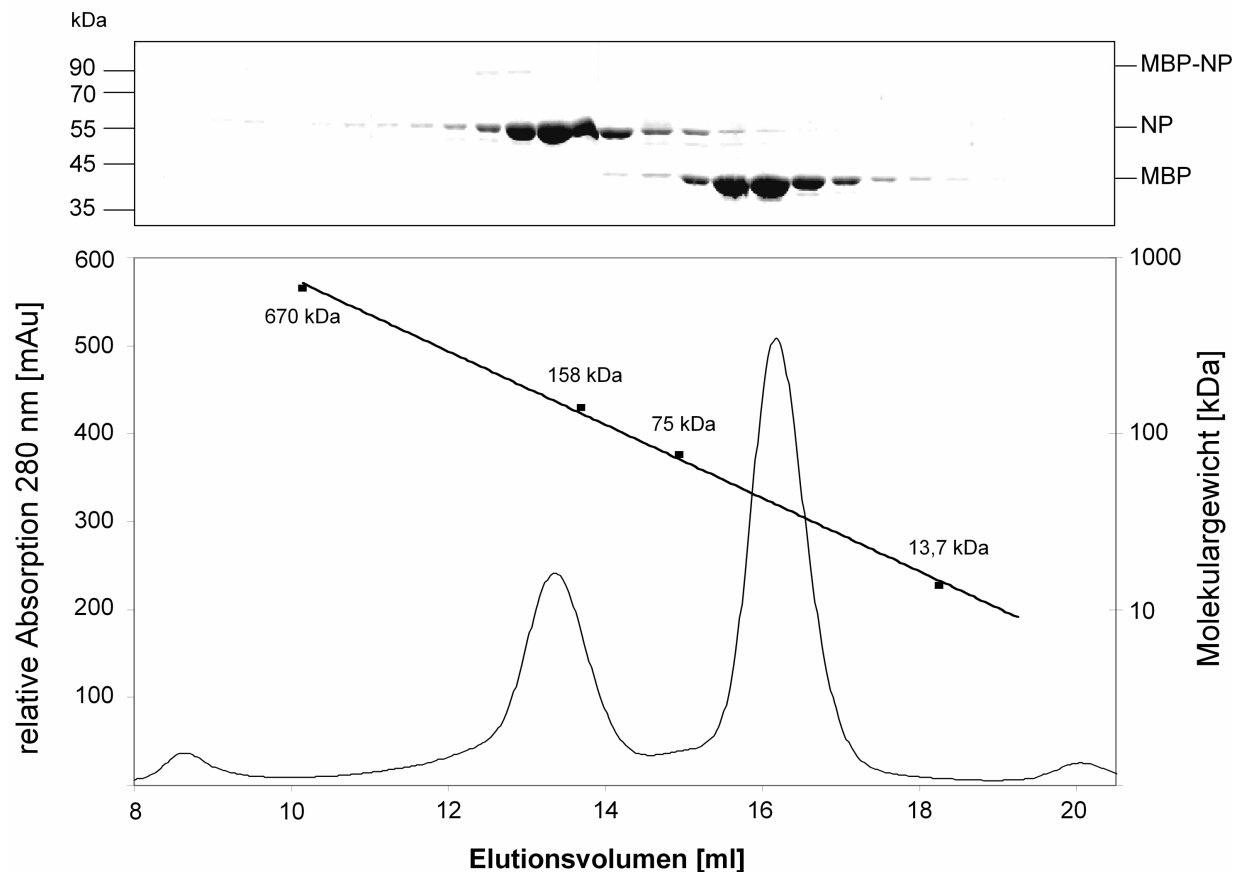


Abb. 13: Gelfiltrationschromatographie zur Trennung von MBP und NP

Die Elutionsfraktionen 2 bis 4 nach Affinitätschromatographie des MBP-NP wurden nach der Spaltung des MBP-NP durch Genenase I vereint und über eine Centricon-Säule mit einem molekularen Filter von 10 kDa auf ein Volumen von 400 µl (Proteingehalt ca. 3 mg/ml) konzentriert. Die in diesem Konzentrat enthaltenen Proteine wurden dann mittels Gelfiltrationschromatographie über eine mit TNE-Puffer prä-equilibrierte Superdex 200 HR 10/60 – Säule bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml / min getrennt. Aliquots einzelner Fraktionen wurden mit 4x Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Als Markerproteine zur Bestimmung des Molekulargewichtsverlaufes der Gelfiltrationssäule wurden Ribonuklease (13,7 kDa), Conalbumin (75 kDa), Aldolase (158 kDa) und Ferritin (670 kDa) verwendet.

Zur Trennung des NP von MBP, dem ungespaltenem Fusionsprotein und der Genenase I wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt (Abb. 13). Im Anschluss an die

Gelfiltration wurden geeignete Fraktionen, die ausschließlich das NP enthielten, vereinigt. Mittels spezieller Zentrifugenröhrchen, die einen Filter enthalten, der nur für Proteine mit einem Molekulargewicht von kleiner als 10 kDa durchlässig ist, wurden die Proben daraufhin ankonzentriert. Das so gereinigte NP wurde näher charakterisiert und für den Vergleich mit eukaryotisch exprimiertem NP verwendet.

4.1.2 Oligomerisierung des Nukleoproteins

Eine wesentliche Eigenschaft viraler Nukleoproteine ist ihre Fähigkeit zur Oligomerisierung (Alfadhli et al., 2001; Ye et al., 2006). Diese Eigenschaft ist von funktioneller Bedeutung und spielt auch bei der Verpackung viraler RNA oder DNA während der Bildung viraler RNP-Komplexe eine wesentliche Rolle.

Über die Oligomerisierung des NP der Arenaviren war zu Beginn dieser Arbeit noch nichts bekannt. Um zu überprüfen, wie das NP des Lassavirus auch in Abwesenheit viraler RNA oligomerisiert, wurde überprüft, welche oligomere Form das gereinigte NP bildet. Da Säugerzellen die natürlichen Wirtszellen des Virus darstellen, wurde das NP sowohl in Bakterien als auch in Säugerzellen exprimiert und die oligomeren Formen verglichen.

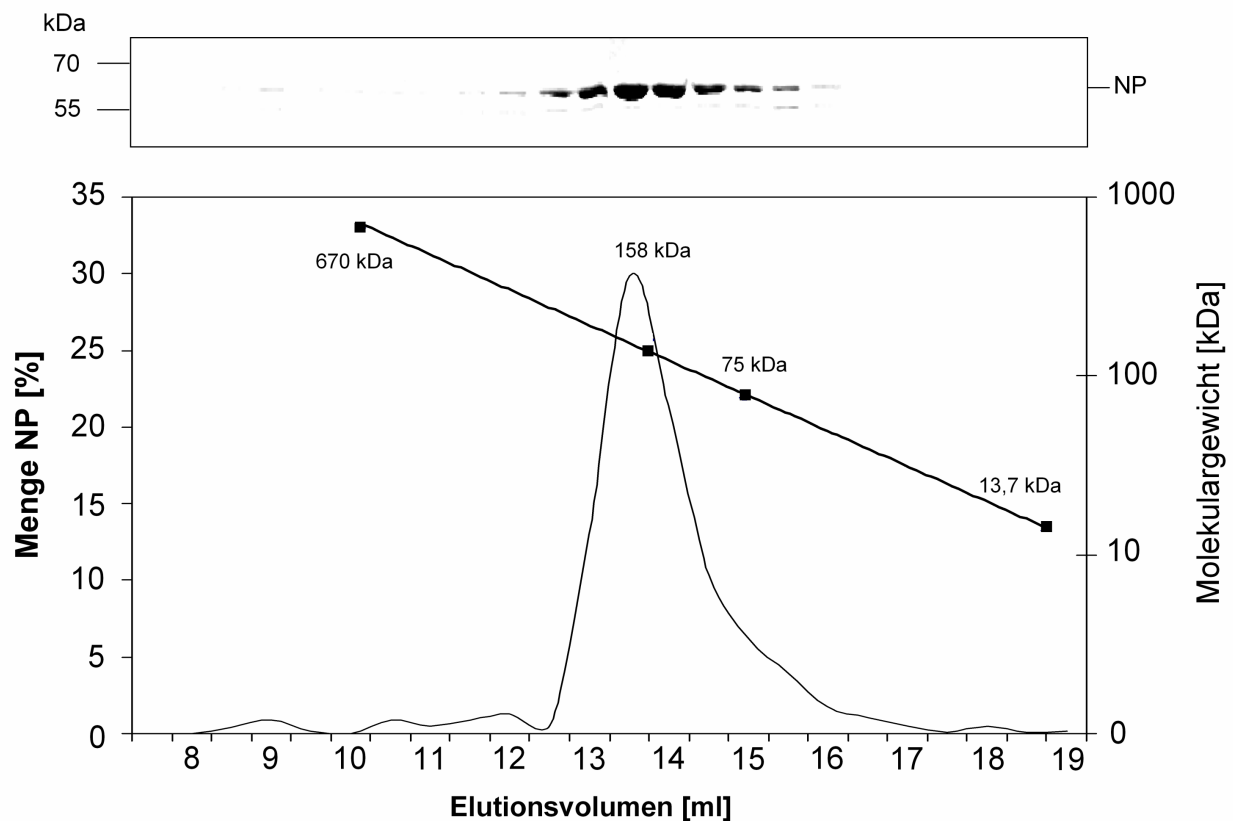


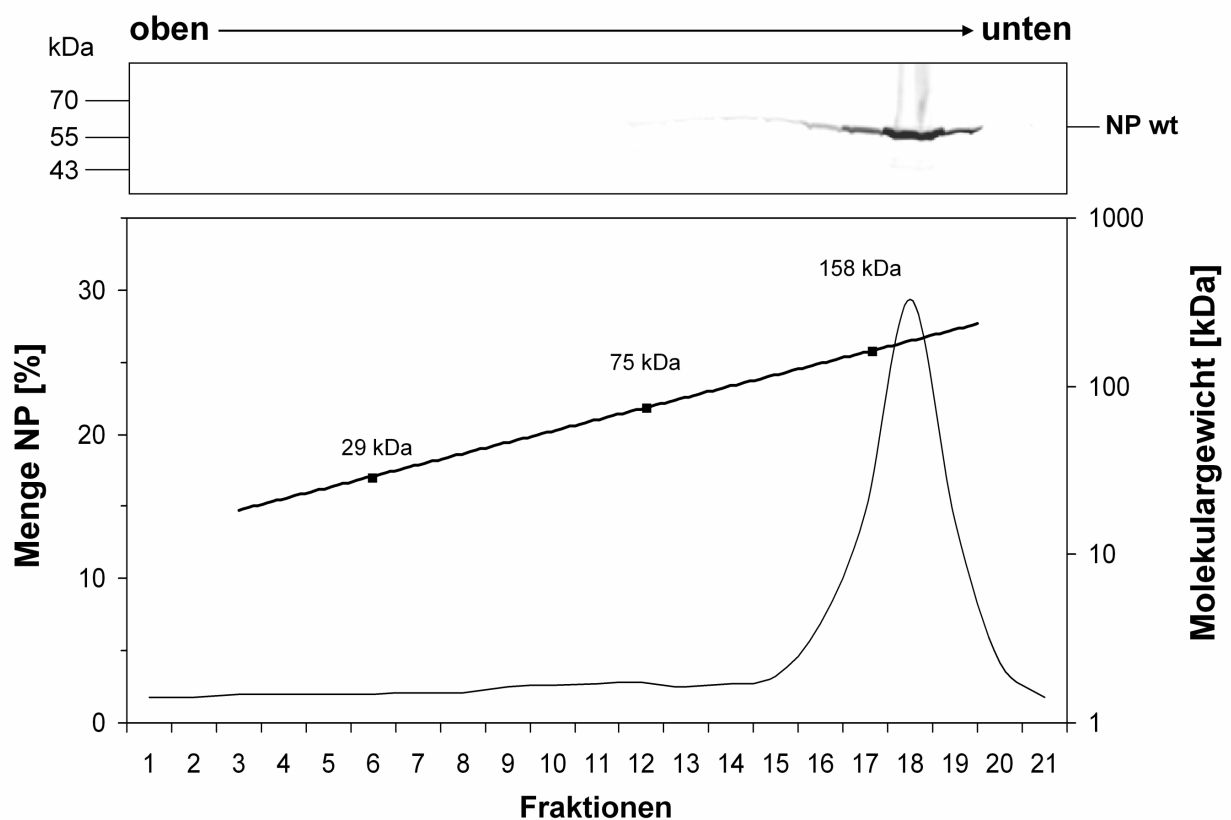
Abb. 14 : Trimerisierung von bakteriell exprimiertem NP

Das Molekulargewicht des NP wurde in gleicher Weise wie für Abb.13 bestimmt.

Für die Analyse der Oligomerisierung des aus *E.coli* gewonnenen NP wurde das NP in *E.coli* des Stammes BL21-Rosetta exprimiert, gereinigt (siehe 4.1.1) und mittels Gel-filtrationchromatographie analysiert. Der Vergleich mit dem Elutionsvolumen verschiedener Molekulargewichtsmarker zeigte, dass das NP vom Elutionsverhalten her einem Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 180 kDa entspricht (Abb. 14). Dies entspricht in guter Näherung einem trimeren Nukleoprotein-Komplex, der ein theoretisches Molekulargewicht von 192 kDa hat.

Da das Expressionsniveau des NP in Säugerzellen im Vergleich mit Bakterien sehr viel geringer ist, wurde das NP aus HEK293T-Zellen isoliert, durch Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Dazu wurde das NP in Säugerzellen exprimiert, durch Lyse der Zellen in den Überstand freigesetzt und anschließend auf einen kontinuierlichen Rohrzucker-Gradienten in PBS_{def} überschichtet. Parallel dazu wurde ein Gradient mit einem Gemisch aus verschiedenen Molekulargewichtsstandards überschichtet, beide Gradienten ultrazentrifugiert und anschließend die Proteine der einzelnen Fraktionen analysiert.

A



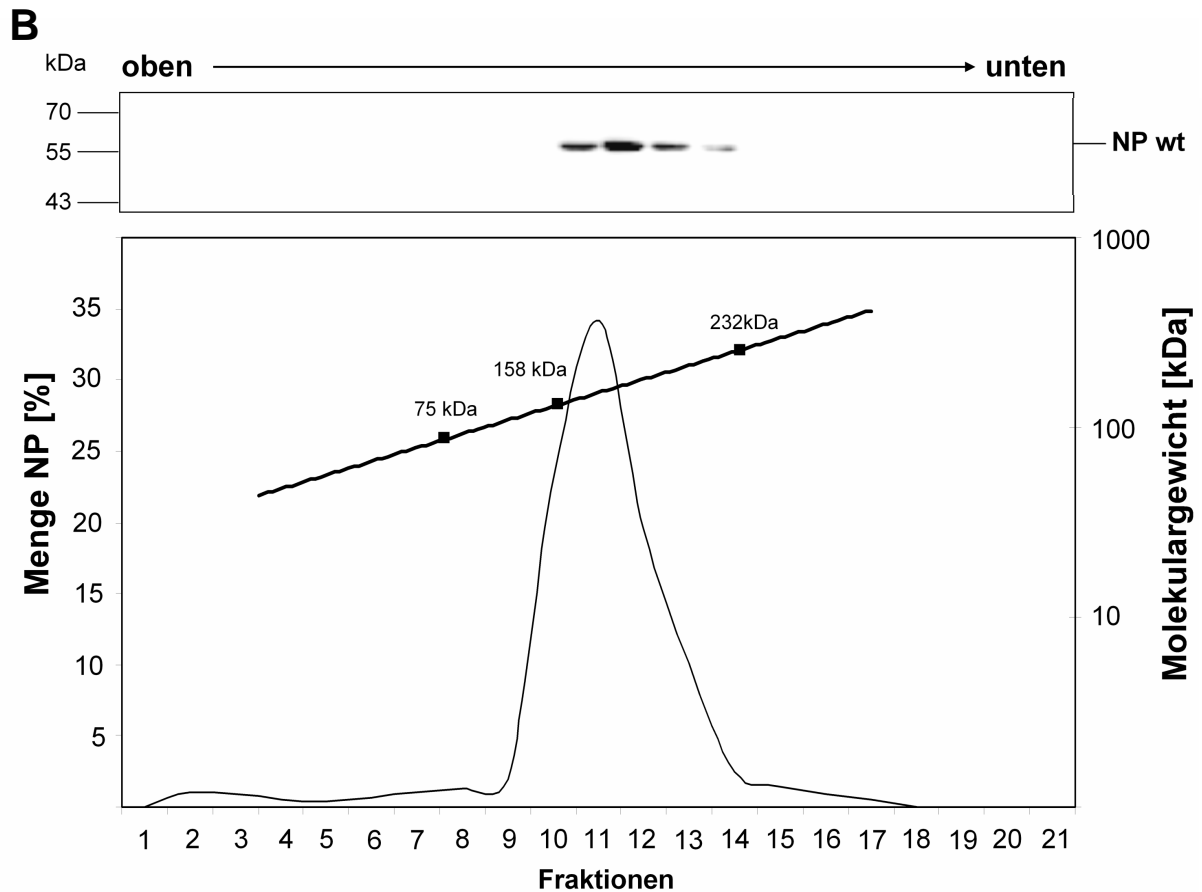


Abb. 15: Trimerisierung von eukaryotisch exprimiertem NP

HEK293T-Zellen wurden mit einem pCAGGS-Plasmid transfiziert, das für wildtypisches NP-HA kodiert (siehe Abb. 17). Nach 48h Stunden wurden die Zellen lysiert und unlösliche von löslichen Bestandteilen getrennt. Der lösliche Überstand wurde anschließend konzentriert und auf einen 0 bis 8 %igen **(A)** oder 5 bis 35 %igen **(B)** Rohrzucker-Gradienten in PBS_{def} überschichtet. Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten in 200 µl – Fraktionen abgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. NP wurde durch einen monoklonalen α -HA Antikörper detektiert. Für jeden der Gradienten wurde ein separater Markergradient mit den Proteinen Carboanhydrase (25 kDa), Conalbumin (75 kDa) und Aldolase (158 kDa) bzw. Conalbumin (75 kDa), Aldolase (158 kDa) und Catalase (232 kDa) zentrifugiert, in 200µl Fraktionen aufgeteilt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Der Vergleich mit dem Laufverhalten verschiedener Molekulargewichtsstandards ergab, dass sich das in Säugerzellen exprimierte NP wie ein Komplex mit einem Molekulargewicht von 186 kDa verhält (Abb. 15A und B), was einem Nukleoprotein-Trimer (theoretisches Molekulargewicht 192 kDa) entspricht. Allerdings konnten keinerlei höheroligomere Formen wie etwa hexamere NP-Komplexe (theoretisches Molekulargewicht 384 kDa) detektiert werden (Abb. 15B). Das NP scheint demnach in Säugerzellen ausschließlich als Trimer vorzuliegen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das NP des Lassavirus in Abwesenheit von viraler RNA Trimere bildet, und dass es keinen Unterschied hinsichtlich der Oligomerisierung des NP bei Expression in Bakterien oder Säugerzellen gibt.

4.1.3 Ultrastruktur des trimeren NP-Komplexes

Um die räumliche Struktur der Nukleoprotein-Trimere zu visualisieren wurde das NP mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

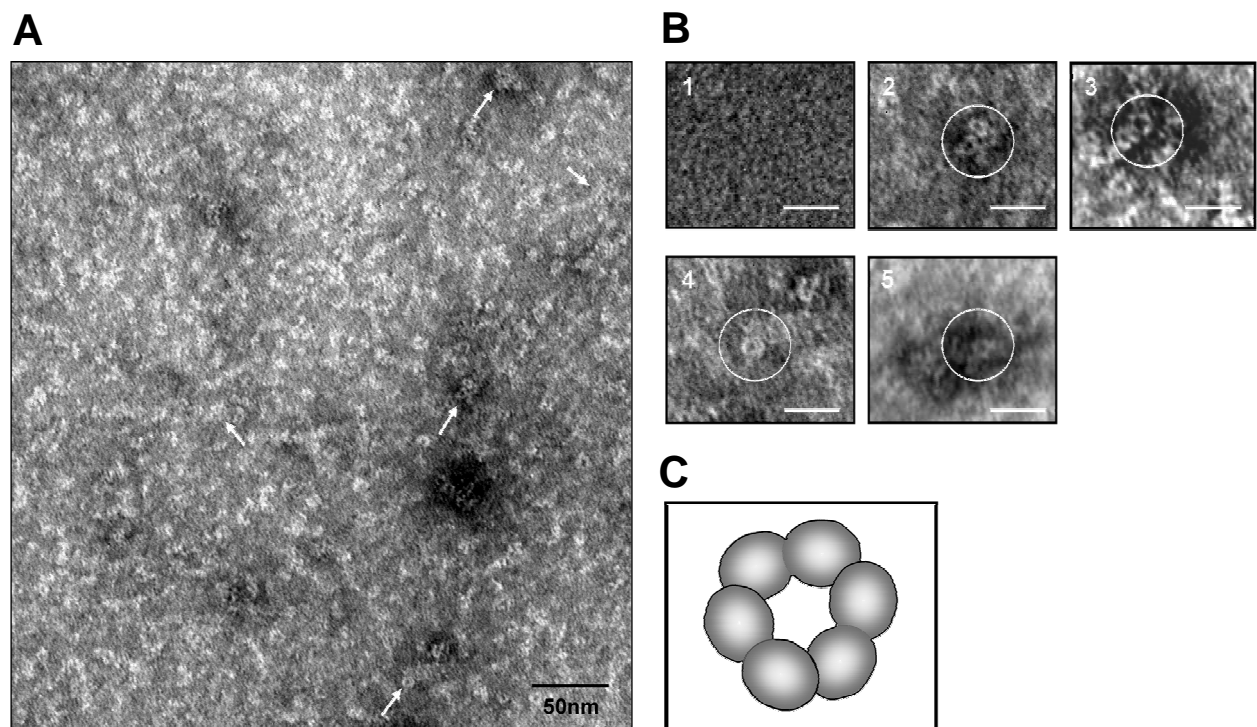


Abb. 16 : Elektronenmikroskopische Untersuchung von rekombinantem, bakteriell exprimiertem NP

(A) Das Nukleoprotein wurde in *E. coli* des Stammes BL21 Rosetta exprimiert, mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt und auf ca. 5 mg/ml konzentriert. 10 µl dieser Proteinsuspension wurden anschließend auf ein Kohlenstoff-beschichtetes Kupfer-Netzchen getropft und für 10 min bei RT inkubiert. Die an das Netzchen gebundenen Proteine wurden daraufhin mit 0,75 % Uranylacetat negativ kontrastiert. Als Kontrolle wurde TNE-Puffer ohne Zusatz von Proteinen (B, Ausschnitt 1) verwendet. Die Aufnahmen wurden von Dr. Larissa Kolesnikova erstellt. **(B)** Zur besseren Visualisierung wurden einzelne Ausschnitte vergrößert (2 bis 6). Der Balken in diesen Ausschnitten entspricht 20 nm. **(C)** Auf Basis der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Modell eines einzelnen NP-Trimers erstellt.

Der Vergleich der NP-Proben mit der Kontrolle zeigt, dass das NP ringförmige Strukturen ausbildet (Abb. 16A, Pfeile). Diese Strukturen weisen einen durchschnittlichen Außendurchmesser von ca. 9 bis 10 nm auf, während der Innendurchmesser ca. 3 nm

beträgt. Ein einzelner Ring besteht aus 3 bis 6 kugelförmigen Untereinheiten (Abb. 16B, Ausschnitte 2 bis 6). Ein Modell dieser Ringe ist in Abb. 16C gezeigt.

4.1.4 Charakterisierung spezifischer Spaltfragmente des Nukleoproteins

Bei der elektrophoretischen Analyse des NP aus eukaryotischen Zellen wurden neben der eigentlichen Proteinbande des NP von ca. 64 kDa oftmals zwei weitere Proteinbanden detektiert. Das Molekulargewicht dieser Proteine lag bei ca. 50 bzw. 52 kDa.

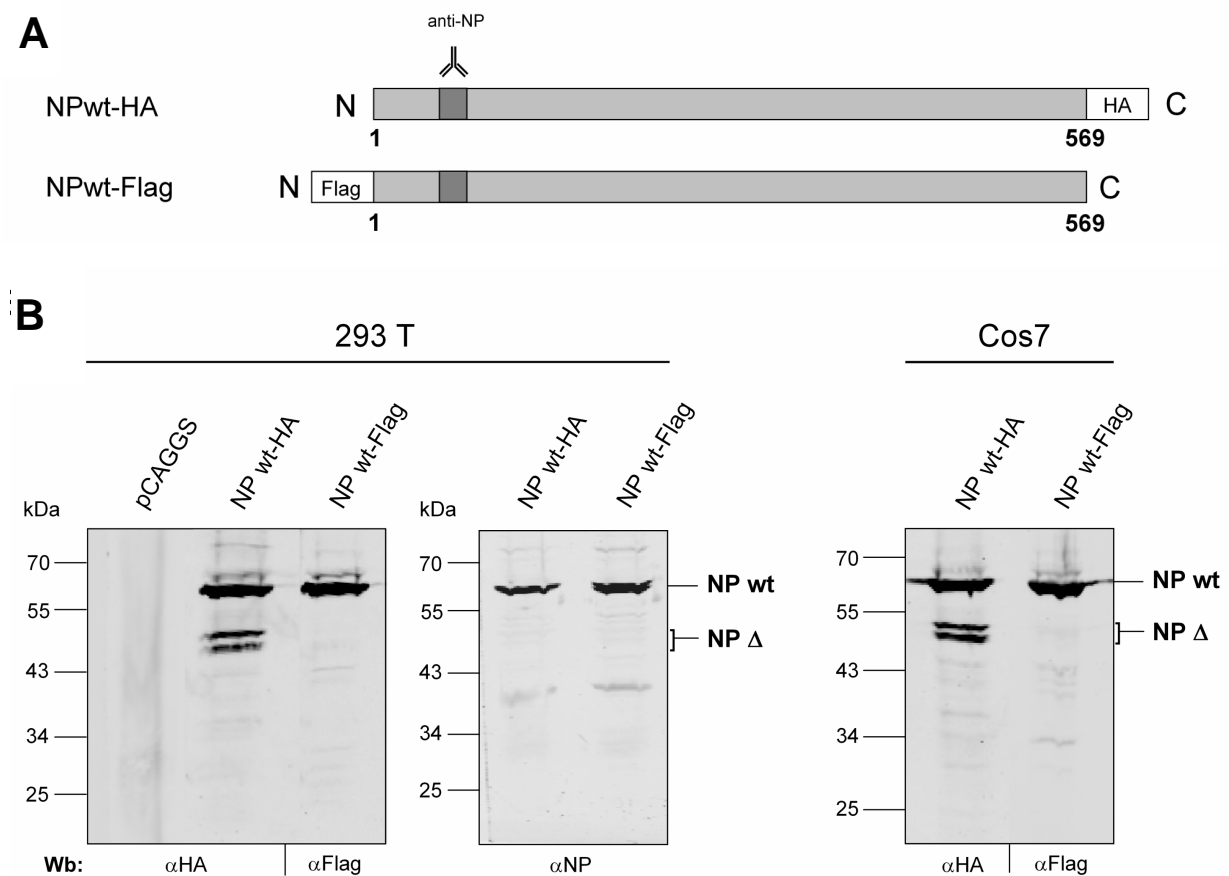


Abb. 17 : Detektion von spezifischen Spaltfragmenten des wildtypischen Nukleoproteins

(A) Das wildtypische NP wurde auf Genebene mit einem N-terminalen Flag-tag sowie einem C-terminalen HA-tag versehen. Gezeigt ist zudem das Binde-Epitop des α -NP Antikörpers. **(B)** HEK293T-Zellen oder Cos7-Zellen wurden mit pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für wildtypisches NP-Flag oder NP-HA kodieren. Als Kontrolle wurde leerer pCAGGS-Vektor transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Zelllysate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zur Detektion des NP wurde ein monoklonaler α -HA und α -Flag-Antikörper bzw. ein polyklonaler α -NP Antikörper verwendet. Wb = Western Blot.

Der Vergleich mit der Kontrolle, bei der HEK293T-Zellen mit Leervektor transfiziert wurden zeigt, dass es sich bei diesen Banden (als NP Δ bezeichnet) um NP-spezifische Produkte

handelt (Abb. 17B). Interessanterweise konnten beide Proteinbanden nur nachgewiesen werden, wenn zur Expression ein NP-Konstrukt mit einem C-terminalen HA-tag verwendet wurde. Dahingegen war keine Detektion möglich, wenn zur Expression wildtypisches NP mit einem N-terminalem Flag-tag verwendet wurde (Abb. 17A und B). Ein ähnliches Muster zeigt sich auch bei der Expression beider Konstrukte in Cos7 – Zellen (Abb. 17B).

Diese Beobachtung legt nahe, dass es sich bei den zusätzlichen Proteinbanden um Spaltprodukte des Wildtyp-NP handelt. Da nur C-terminal getagte NP-Konstrukte detektiert werden konnten, findet die Spaltung wahrscheinlich in der Nähe des N-Terminus statt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das NP nach Expression in HEK293T-Zellen mit einem NP-spezifischen Antikörper detektiert. Das Binde-Epitop dieses Antikörpers umfasst die Aminosäuren 53-73, liegt also nahe des N-Terminus. Bei Expression des Flag- oder HA-getagten NP war mit diesem Antikörper keine Detektion der Spaltfragmente möglich (Abb. 17B), was die Vermutung bestärkt, dass die Spaltprodukte durch Spaltung des NP nahe des N-Terminus entstehen.

Für das wildtypische NP wurde gezeigt, dass es in eukaryotischen Zellen ausschließlich Trimere bildet (Abb. 15B). Es war daher von Interesse, die Spaltfragmente hinsichtlich ihrer Oligomerisierung zu untersuchen. Dazu wurde wildtypisches, HA-getagtes NP in HEK293T-Zellen exprimiert, die Zellen lysiert, lösliche von unlöslichen Proteinen abgetrennt und anschließend mittels Dichtegradientenzentrifugation analysiert.

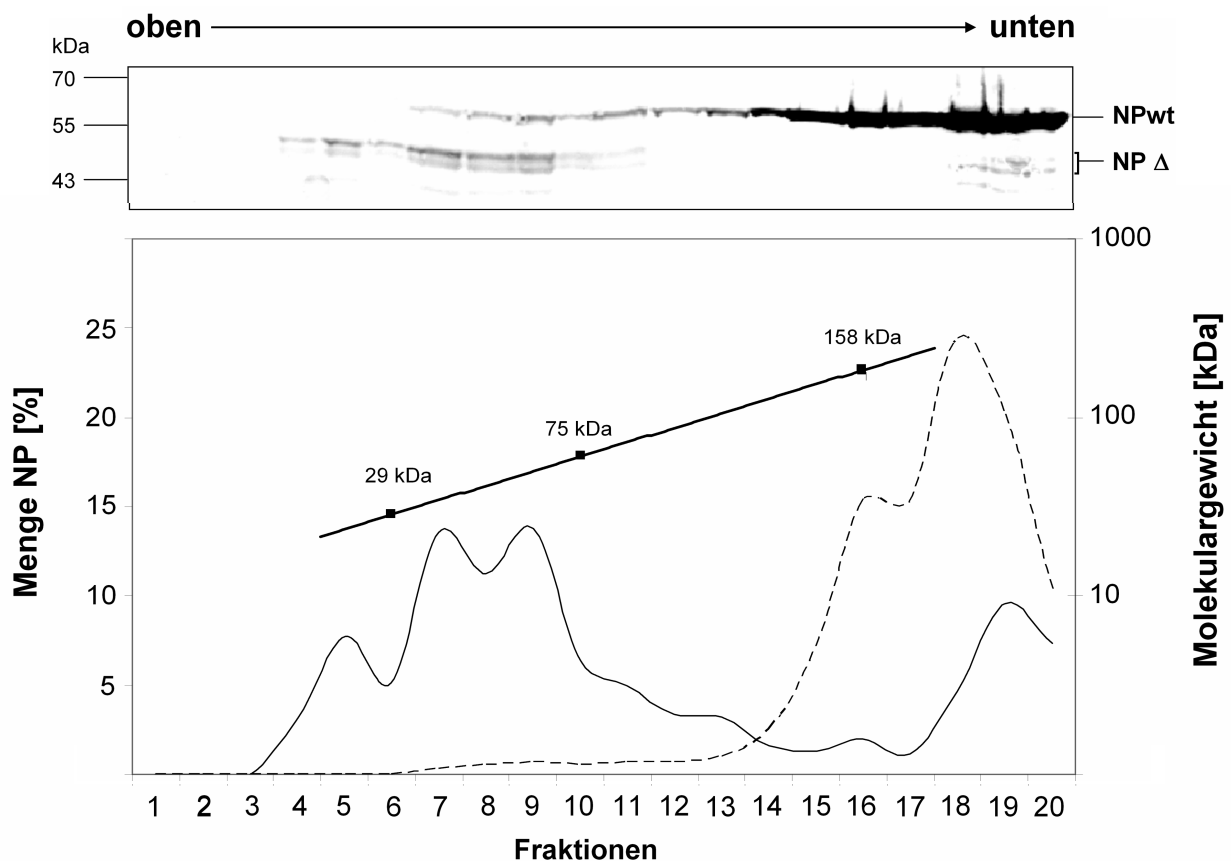


Abb. 18: Auftrennung der Spaltfragmente des wildtypischen Nukleoproteins

HEK293T-Zellen wurden mit einem pCAGGS-Plasmid transfiziert, das für wildtypisches NP-HA kodiert. Nach 48h Stunden wurden die Zellen lysiert und unlösliche von löslichen Bestandteilen getrennt. Der lösliche Überstand wurde anschließend konzentriert und auf einen 0 bis 8 %igen Rohrzucker-Gradienten in PBS_{def} überschichtet. Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten in 200 µl – Fraktionen aufgeteilt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. NP wurde durch einen monoklonalen α -HA Antikörper detektiert. Parallel dazu wurde ein separater Markergradient mit den Proteinen Carboanhydrase (29 kDa), Conalbumin (75 kDa) und Aldolase (158 kDa) zentrifugiert, ebenfalls in 200 µl – Fraktionen aufgeteilt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Durchgezogene Linie = NP Δ , gestrichelte Linie = Volle-Länge-NP.

Die Analyse im Rohrzucker-Dichtgradienten zeigte, dass sich beide Spaltfragmente wie Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa verhalten (Abb. 18). Ein Trimer dieser Fragmente (theoretisches Molekulargewicht 150 kDa) wäre in der Fraktion 15 zu erwarten, doch sind beide Spaltfragmente in dieser Fraktion nicht zu detektieren. Dies zeigt, dass die Spaltfragmente im Gegensatz zu wildtypischem NP voller Länge als Monomere in der Zelle vorliegen.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass das Nukleoprotein des Lassavirus in Abwesenheit viraler RNA ausschließlich Trimere bildet (Abb. 14 und 15). Bei diesen Trimeren handelt es um ringförmige, rotationssymmetrische Strukturen (Abb. 16). Die Trimerisierung selbst ist unabhängig vom verwendeten Expressionssystem, was darauf hinweist, dass eventuelle posttranslationale Modifikationen wie z.B. die für das NP des LCMV beschriebene Phosphorylierung (siehe 5.1) keinen Einfluss auf die Oligomerisierung des NP haben. Im nächsten Schritt wurden nun die für die Trimerisierung des NP verantwortlichen Domänen näher charakterisiert.

4.2 Charakterisierung der NP – NP – Interaktion

Nachdem nun bekannt war, das NP Trimere bildet (siehe Abb. 14 und 15), sollten die daran beteiligten Domänen innerhalb des NP eingegrenzt und näher charakterisiert werden. Dazu wurden verschiedene Deletionsmutanten hergestellt, welche hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Interaktion mit wildtypischem NP mittels Ko-Immunpräzipitationsstudien untersucht wurden.

Ausgehend vom N- bzw. C-Terminus des NP wurden verschieden lange Abschnitte des Proteins deletiert (siehe Abb. 19A und 20A). Um die durch die Deletion hervorgerufenen Änderungen an der Proteinstruktur so gering wie möglich zu halten, wurde zunächst eine Sekundärstrukturvorhersage³ des wildtypischen NP durchgeführt (Ergebnis der Analyse siehe Anhang A2). Bei der Auswahl der Schnittstellen wurde darauf geachtet, potentielle Sekundärstrukturen nicht zu zerstören. Zur besseren Detektion und Fällung bei Ko-Immunpräzipitationsstudien wurden die Deletionsmutanten mit einem C-terminalen HA- oder Flag-tag versehen.

4.2.1 Interaktion von N-terminalen NP-Deletionsmutanten mit wildtypischem NP

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die Spaltung des NP nahe des N-Terminus dazu führt, dass die entsprechenden Spaltprodukte nur noch als Monomer vorliegen (siehe Abb. 18). Es war daher von Interesse zu überprüfen, welchen Einfluss der N-terminale Teil des NP auf die Interaktion zwischen einzelnen NP-Monomeren hat. Daher wurden Deletionsmutanten, bei denen verschieden große Bereiche des N-terminalen Anteils deletiert wurden (Abb. 19A) mit wildtypischen NP ko-exprimiert und anschließend Ko-Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Um auszuschließen, dass eine fehlende Interaktion auf einer durch die Deletionen hervorgerufenen „Fehlverteilung“ der Mutanten innerhalb der Zelle zurückzuführen ist, wurde die zelluläre Verteilung der einzelnen Mutanten durch Immunfluoreszenz analysiert.

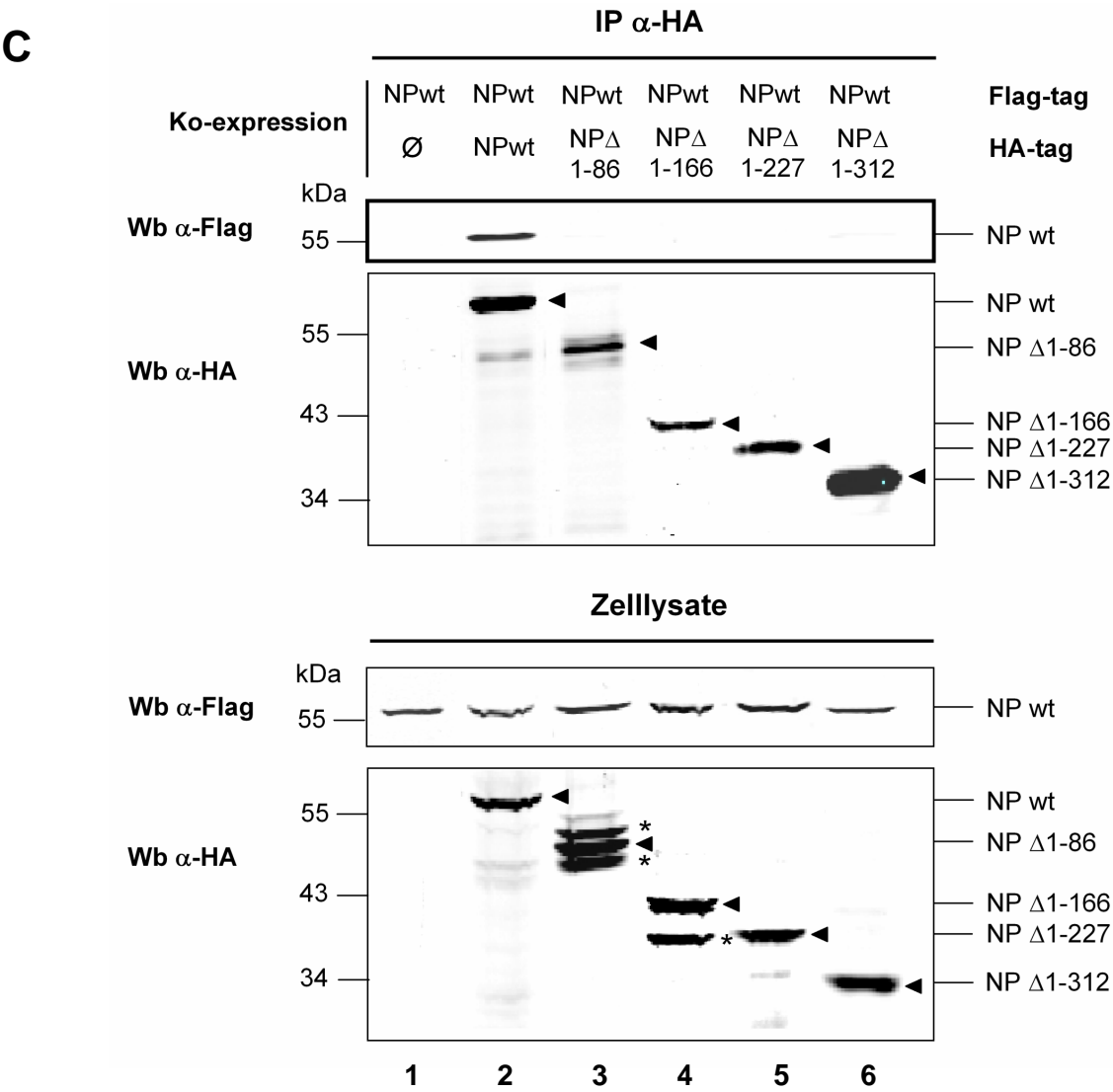
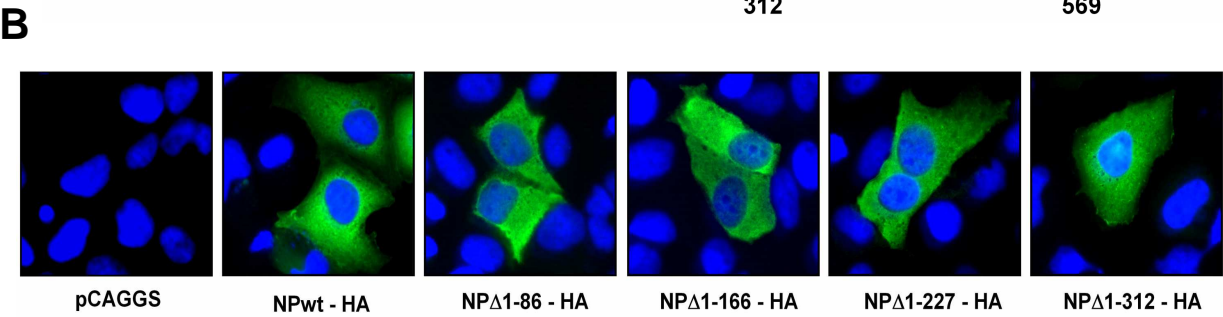
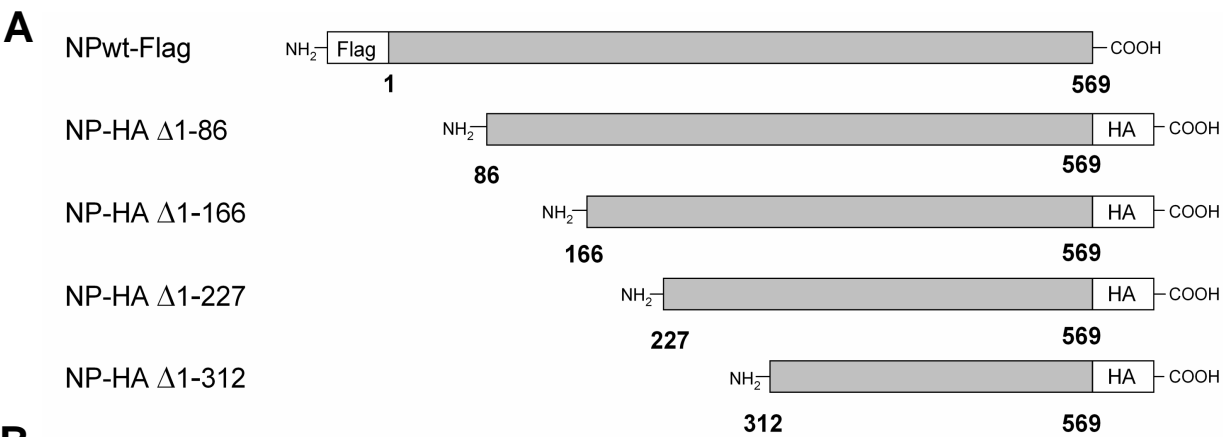


Abb. 19 : Interaktion von wildtypischem NP mit N-terminalen Deletionsmutanten

(A) Schematische Abbildung der verwendeten Nukleoproteinkonstrukte. **(B)** HuH7-Zellen (siehe 3.4.6) wurden mit pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für wildtypisches NP-Flag oder verschiedene Deletionsmutanten kodieren. Als Kontrolle wurde leerer pCAGGS-Vektor transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und anschließend mit einem monoklonalen α -HA Antikörper inkubiert. NP wurde daraufhin durch Inkubation mit einem FITC-gekoppelten α -Maus Sekundärantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt. **(C)** HEK293T-Zellen wurden mit pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für wildtypisches NP-HA oder verschiedene N-terminale Deletionsmutanten kodieren. Zu jedem Ansatz wurde ein pCAGGS-Plasmid ko-transfiziert, das für wildtypisches NP-Flag kodiert. Als Kontrolle wurde wildtypisches NP-Flag alleine transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und einer Ko-Immunpräzipitation unter Verwendung eines monoklonalen α -HA Antikörpers unterzogen. Ko-Immunpräzipitiertes, wildtypisches NP wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem polyklonalen α -Flag Antikörper detektiert. Eine Probe der Zellysate wurde vor der Ko-Immunpräzipitation mittels SDS-PAGE und Western Blot aufgetrennt, um die Expression der einzelnen Proteine mittels eines monoklonalen α -HA und eines polyklonalen α -Flag Antikörpers zu überprüfen. Pfeile zeigen die Position wildtypischen NPs bzw. der Deletionsmutanten an, Sterne markieren unspezifische Produkte. Wb = Western Blot.

Die Ko-Immunpräzipitation zeigte, dass das NP in der Lage ist, homotypische Interaktionen einzugehen (Abb. 19C, Spur 2). Bei Fällung der N-terminalen Deletionsmutanten war zu beobachten, dass bereits nach Deletion der ersten 86 N-terminalen Aminosäuren des NP keine Interaktion zwischen der entsprechenden Mutante und wildtypischen NP stattfindet (Abb. 19C, Spuren 3 bis 6). Die Immunfluoreszenzanalysen zeigten dabei, dass diese fehlende Interaktion nicht auf eine andersartige Verteilung der Mutanten zurückzuführen ist, da die Deletionsmutanten dieselbe zelluläre Verteilung wie wildtypisches NP aufweisen (Abb. 19B). Da alle Mutanten zudem in mit Wildtyp-NP vergleichbaren Mengen exprimiert werden (Abb. 19C, Zellysat), lässt sich auch ein Unterschied im Expressionsniveau als möglicher Grund für die stark verminderte Interaktion der Deletionsmutanten mit wildtypischem NP ausschließen. In der Summe weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass der Bereich der ersten 86 N-terminalen Aminosäuren kritisch für die homotypische NP-NP-Interaktion ist.

4.2.2 Interaktion von C-terminalen NP-Deletionsmutanten mit wildtypischem NP

Da nun bekannt war, dass N-terminale Proteinbereiche kritisch für die korrekte homotypische NP-Interaktion sind, wurden die Untersuchungen auf C-terminale Bereiche des NP ausgeweitet. Deletionsmutanten, bei denen verschieden große Bereiche des C-Terminus deletiert wurden (Abb. 20A), wurden dazu mit wildtypischen NP ko-exprimiert. Die Interaktion zwischen den Mutanten und wildtypischem NP wurde anschließend mittels Ko-

Immunpräzipitation analysiert. Die zelluläre Verteilung der Deletionsmutanten wurde zudem durch Immunfluoreszenz analysiert und mit Wildtyp-NP verglichen.

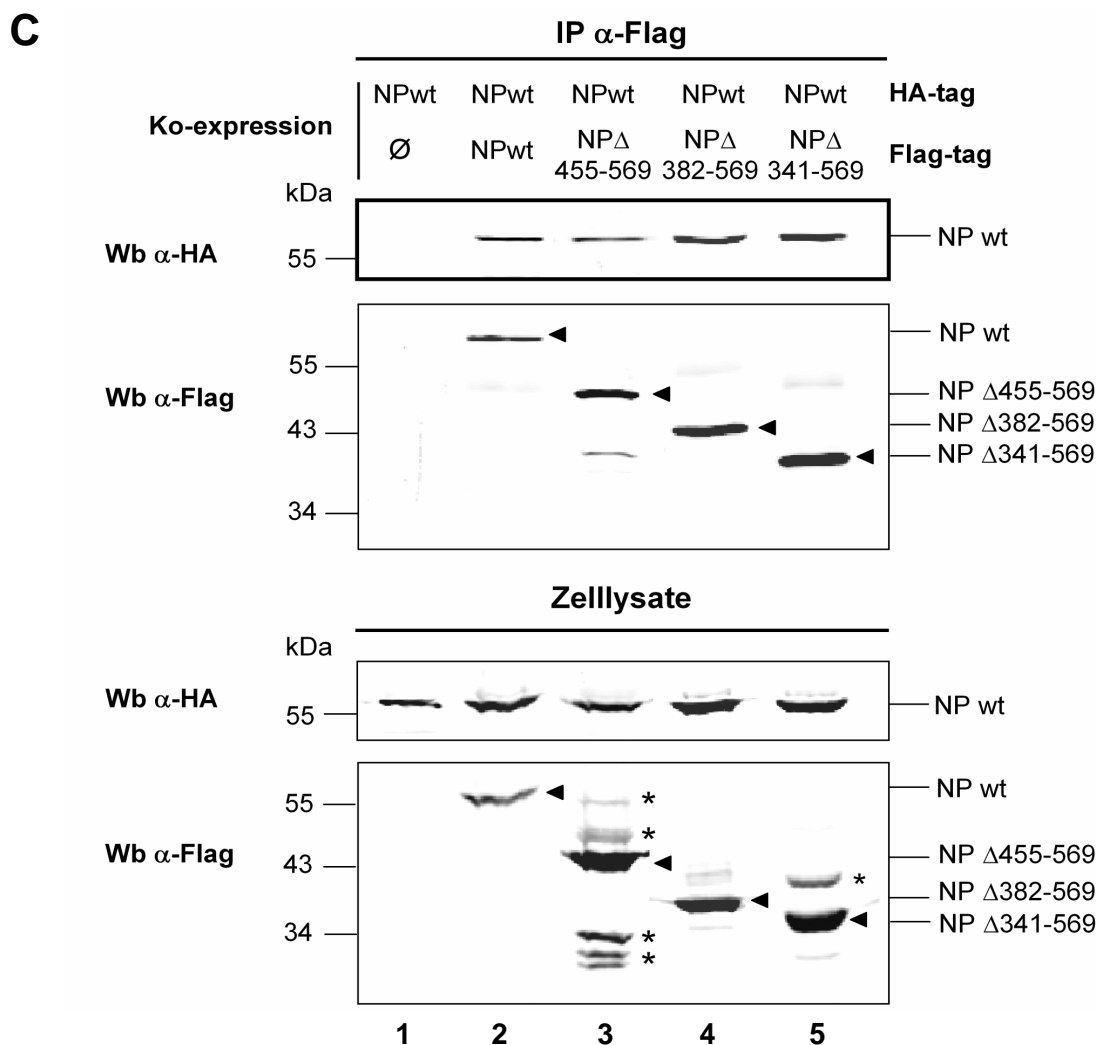
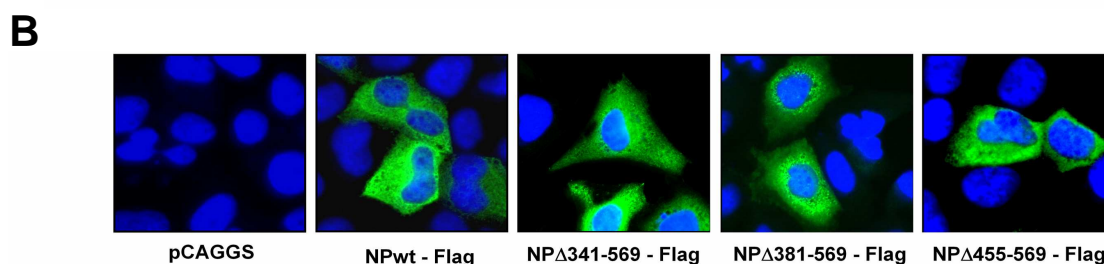
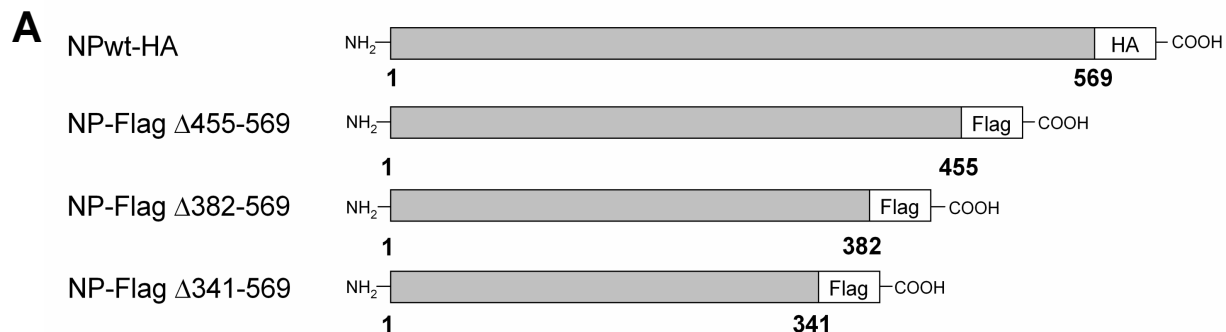


Abb. 20: Interaktion von wildtypischem NP mit C-terminalen Deletionsmutanten

(A) Schematische Abbildung der verwendeten Nukleoproteinkonstrukte. **(B)** HuH7-Zellen (siehe 3.4.6) wurden mit pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für wildtypisches NP-Flag oder verschiedene Deletionsmutanten kodieren. Als Kontrolle wurde leerer pCAGGS-Vektor transfiziert. Die Immunfluoreszenzanalyse wurde wie in der Bildunterschrift für Abb. 19B beschrieben durchgeführt. **(C)** HEK293T-Zellen wurden pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für wildtypisches NP-Flag oder verschiedene C-terminale Deletionsmutanten kodieren. Zu jedem Ansatz wurde ein pCAGGS-Plasmid ko-transfiziert, das für wildtypisches NP-HA kodiert. Als Kontrolle wurde wildtypisches NP-HA alleine transfiziert. Die Ko-Immunpräzipitation erfolgte unter Verwendung eines monoklonalen α -Flag Antikörpers wie in der Bildunterschrift für Abb. 19C beschrieben. Pfeile zeigen die Position wildtypischen NPs bzw. der Deletionsmutanten an, Sterne markieren unspezifische Produkte. Wb = Western Blot.

Die Analyse der Interaktion zwischen C-terminalen Deletionsmutanten und wildtypischem NP zeigte, dass selbst die Deletion großer C-terminaler Proteinbereiche nicht zu einer Verminderung der Interaktion zwischen Wildtyp-NP und den entsprechenden Mutanten führt (Abb. 20C, Spur 3 bis 5). Die dabei eingesetzten Mutanten weisen eine mit Wildtyp-NP vergleichbare zelluläre Verteilung und ein ähnliches oder sogar höheres Expressionniveau auf (Abb. 20B und Abb. 20C, Zellysat). Zudem korreliert die Menge an Ko-präzipitiertem NP mit der Präzipitation der jeweiligen Mutante (Abb. 20C, IP), die beobachtete Ko-Fällung des wildtypischen NP lässt sich also auf eine spezifische Interaktion zwischen wildtypischem NP und den Mutanten zurückführen.

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass Proteinbereiche im nahen N-Terminus kritisch für die homotypische NP-NP-Interaktion sind. Im Gegensatz dazu wirken sich Deletionen von bis zu 228 Aminosäuren ausgehend vom C-Terminus des Proteins nicht negativ auf diese Interaktion aus. Aus diesen Beobachtungen lässt sich die Hypothese ableiten, dass die Interaktion zwischen einzelnen NP-Molekülen durch spezifische Proteinbereiche nahe des N-Terminus des NP vermittelt wird. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde dieser Bereich näher untersucht, um spezifische, für die NP-NP-Interaktion wichtige Aminosäuren einzugrenzen.

4.2.3 Eingrenzung und Charakterisierung der NP-NP-Interaktionsdomäne

Zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchungen waren keine Strukturinformationen für das Nukleoprotein des Lassavirus verfügbar. Daher wurde eine Sekundärstrukturvorhersage am wildtypischen NP durchgeführt, um so einen Hinweis auf Strukturen zu erhalten, die möglicherweise die NP-NP-Interaktion erklären könnten.

Die *in silico* Analyse⁴ zeigte, dass der N-terminale Bereich des NP aus überwiegend α -Helices besteht (siehe Anhang A2). Bei genauerer Betrachtung dieser Sekundärstrukturvorhersage fiel auf, dass sich in der Nähe des N-Terminus zwei α -Helices finden, die durch 20 Aminosäuren voneinander getrennt sind und die vorwiegend die hydrophoben Aminosäuren Leucin und Valin enthalten (Abb. 21A, Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$).

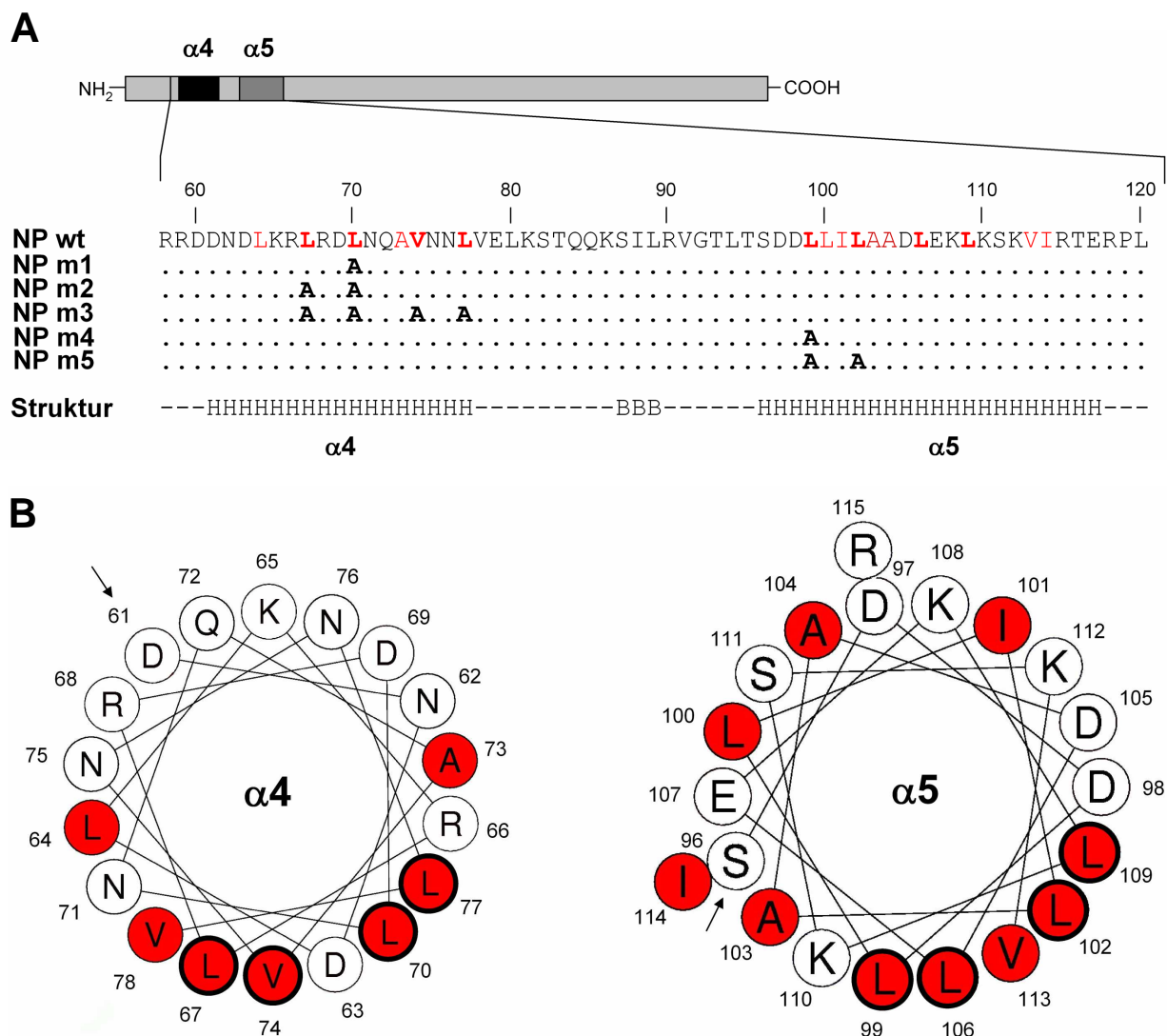


Abb. 21: Alanin-Substitutionsmutanten zur Untersuchung der NP-NP-Interaktion

(A) Schematisch abgebildet sind die Positionen zweier α -Helices ($\alpha 4$, AS 61-78, schwarzer Kasten und $\alpha 5$, AS 96-113 grauer Kasten) im N-terminalen Bereich des Wildtyp-NP. In der Aminosäuresequenz dieser α -Helices sind hydrophobe Aminosäuren rot markiert, Leucine und Valine an den Positionen 1 und 4 sind fett hervorgehoben, wobei der jeweilige Austausch dieser Aminosäuren für die entsprechenden Mutanten gekennzeichnet ist. Die durch *in silico*-Analyse⁴ ermittelte Sekundärstruktur ist unterhalb der Aminosäuresequenz abgebildet (H= α -Helix, B = β -Faltblatt). (B) Darstellung der Position individueller Aminosäuren entlang der Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$. Die Helices sind in einer Aufsicht gezeigt. Hydrophobe Aminosäuren sind rot unterlegt. Pfeile zeigen die erste Aminosäure der jeweiligen Helix-Abbildung an.

Da eine volle Umdrehung einer α -Helix genau 3,6 Aminosäurereste umfasst, hat die Anordnung der Aminosäuren zur Folge, dass hydrophobe Aminosäuren wie Valin und Leucin entlang der Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ charakteristische Positionen auf einer Seite der Helix einnehmen, während sich auf der gegenüberliegenden vorwiegend geladene Aminosäuren befinden (Abb. 21B, Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$). Unterteilt man die Helices dabei in sieben Aminosäuren umfassende Abschnitte, so stehen insbesondere die langkettigen, hydrophoben Aminosäuren Valin und Leucin an den Positionen 1 und 4 dieser Abschnitte (Abb. 21B, fett unterlegte Aminosäuren).

Helices mit diesem spezifischen Muster langkettiger, hydrophober Aminosäuren sind dafür bekannt, eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen zu spielen (Burkhard et al, 2011). Es war daher von Interesse zu überprüfen, welche Funktion diese Helices bei der NP-NP-Interaktion einnehmen und ob eine homotypische NP-NP-Interaktion durch die langkettigen, hydrophoben Aminosäuren innerhalb der Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ vermittelt werden könnte. Dies würde erklären, warum bereits die Deletion der ersten 86 Aminosäuren zu einem nahezu vollständigen Verlust der Interaktion zwischen der entsprechenden Mutante und dem wildtypischen NP (Abb. 19, Spur 3) führt, da durch diese Deletion die gesamte Helix $\alpha 4$ aus dem Protein entfernt wird.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Substitutionsmutanten hergestellt, bei denen die Leucine bzw. das Valin der Helix $\alpha 4$ (Abb. 21A, NPm1-m3) oder der Helix $\alpha 5$ (Abb. 21A, NPm4 und m5) gegen Alanin ausgetauscht wurden. Alanin wurde als Substituent gewählt, da bekannt ist, dass Alanin in hohem Maße zur Stabilität einer α -Helix beiträgt (Lyu et al., 1990; O'Neil and DeGrado, 1990) und dass sich der Austausch verschiedener Aminosäuren innerhalb einer Helix gegen Alanin nicht negativ auf die Konformation dieser Helix auswirkt (Heinz et al., 1992). Im Gegensatz zu Leucin oder Valin besitzt Alanin zudem nur eine Methylgruppe als kurze, hydrophobe Seitenkette, welche keinen wesentlichen Anteil zur hydrophoben Interaktion beiträgt. Somit ist zu erwarten, dass eine derartige Substitution eventuelle vorhandene hydrophobe Interaktionen unterbindet.

Im späteren Verlauf dieser Arbeit veröffentlichte Studien wiesen neben weiteren N-terminalen Aminosäuren auch dem C-Terminus des NP eine Rolle bei der NP-NP-Interaktion zu (siehe 5.2). Auf Basis dieser Arbeit wurden zusätzlich zu den Mutanten NPm1 - NPm5 weitere Alanin-Substitutionsmutanten erstellt (Abb. 22, NPm6 und m7).

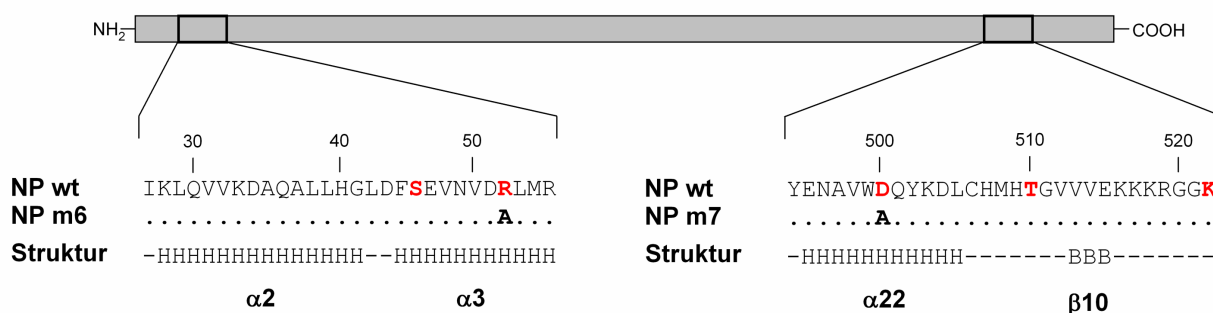
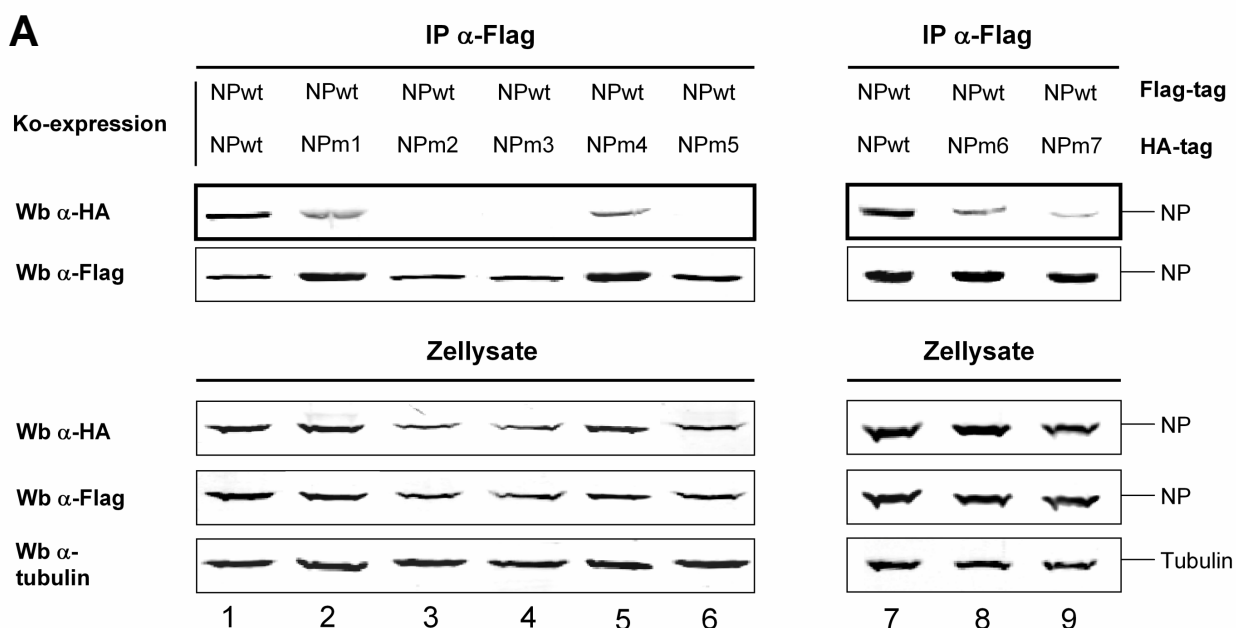


Abb. 22: Alanin-Substitutionsmutanten im N- und C-terminalen Bereich des NP

Schematisch abgebildet sind Aminosäurebereiche nahe des N- und C-Terminus, die potentiell an der NP-NP-Interaktion beteiligt sind. Aminosäuren, die Kontakte zwischen einzelnen NP-Monomeren vermitteln könnten, sind rot hervorgehoben. Der jeweilige Austausch dieser Aminosäuren ist für die entsprechenden Mutanten gekennzeichnet. Die Sekundärstruktur ist unterhalb der Aminosäuresequenz abgebildet (H= α-Helix, B = β-Faltblatt).

Um die Funktionalität dieser Mutanten sowie der Alanin-Substitutionsmutanten NPm1 – NPm5 in Hinsicht auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit wildtypischem NP zu überprüfen, wurden sie zusammen mit Wildtyp-NP ko-exprimiert und anschließend einer Ko-Immunpräzipitation unterzogen.



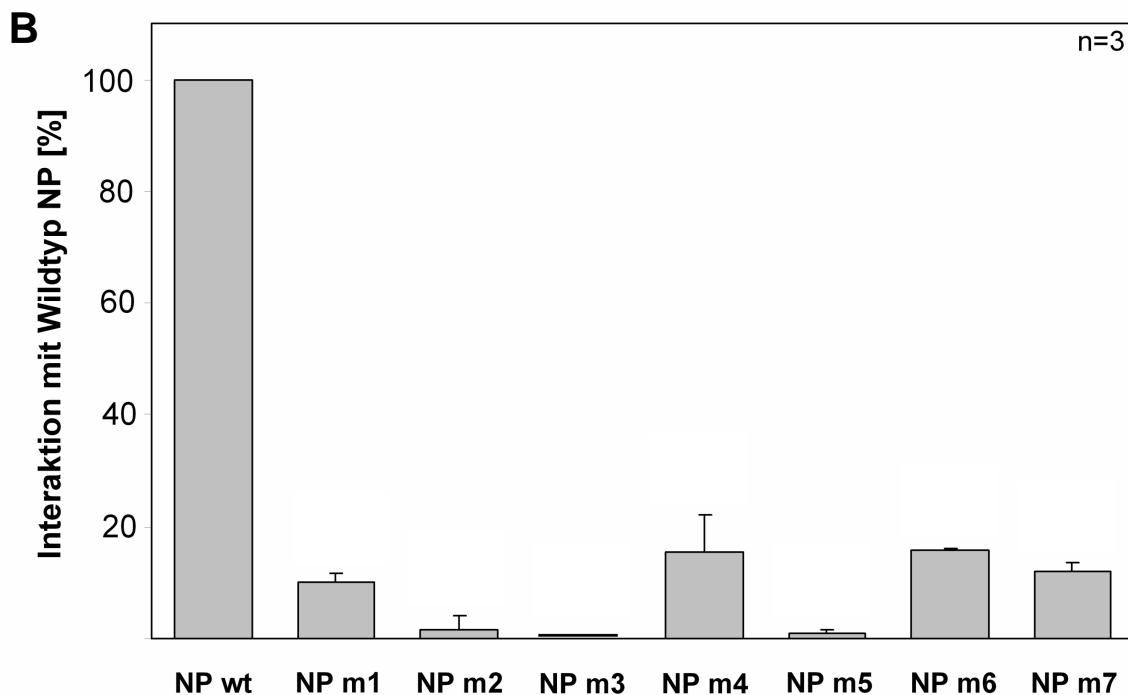


Abb. 23: Interaktion zwischen wildtypischem NP und Alanin-Substitutionsmutanten

(A) HEK293T-Zellen wurden mit pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für verschiedene Alanin-Substitutionsmutanten kodieren. Zu jedem Ansatz wurde ein pCAGGS-Plasmid ko-transfiziert, das für wildtypisches NP-Flag kodiert. Als Kontrolle wurde wildtypisches NP-Flag alleine transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und einer Ko-Immunpräzipitation unter Verwendung eines polyklonalen α -Flag Antikörpers unterzogen. Die Ko-Immunpräzipitation der Mutanten wurde durch SDS-PAGE und Western Blot mit einem monoklonalen α -HA Antikörper untersucht. Eine Probe der Zellysate wurde vor der Ko-Immunpräzipitation mittels SDS-PAGE und Western Blot aufgetrennt, um die Expression der einzelnen Proteine mittels eines monoklonalen α -HA und eines polyklonalen α -Flag Antikörpers zu überprüfen. Tubulin wurde durch einen monoklonalen α -Tubulin Antikörper detektiert. Wb = Western Blot. **(B)** Quantitative Auswertung dreier unabhängiger Experimente, wie unter (A) beschrieben. Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mittels der Odyssey-Software (siehe 3.4.7).

Bei der Untersuchung der Alanin-Substitutionsmutanten zeigte sich, dass bereits der Austausch einzelner Leucine in den Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ ausreicht, um die Ko-Fällung der entsprechenden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp stark herabzusetzen (Abb. 23A, Spuren 2 und 5), während bei Austausch von 2 oder mehr langkettigen, hydrophoben Aminosäuren (Leucin und Valin) keinerlei Ko-Präzipitation der Mutanten festzustellen ist (Abb. 23A, Spuren 3, 4 und 6). Auch die Mutanten NPm6 und NPm7 zeigen deutlich reduzierte NP-NP-Interaktion (Abb. 23A, Spuren 8 und 9). Um diese Beobachtung quantitativ auszuwerten, wurden die Menge der Ko-präzipitierten Mutanten durch die Quantifizierung der Proteinbanden in drei unabhängigen Ansätzen ermittelt und jeweils mit dem Wildtyp

verglichen (Abb. 23B). Diese Quantifizierung bestätigte die vorherige Beobachtung und zeigte, dass der Austausch der einzelnen Leucine und Valine innerhalb der Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$, sowie der Aminosäuren R52 und D500 die NP-NP-Interaktion stark beeinflusst.

Da es durch den Austausch der hydrophoben Aminosäuren in den Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ sowie der Aminosäuren R52 und D500 evtl. zu einer Miss-Lokalisation der entsprechenden Mutanten kommen könnte, wurde die subzelluläre Verteilung der Mutanten mittels Immunfluoreszenzanalyse überprüft und mit wildtypischem NP verglichen (Abb. 24).

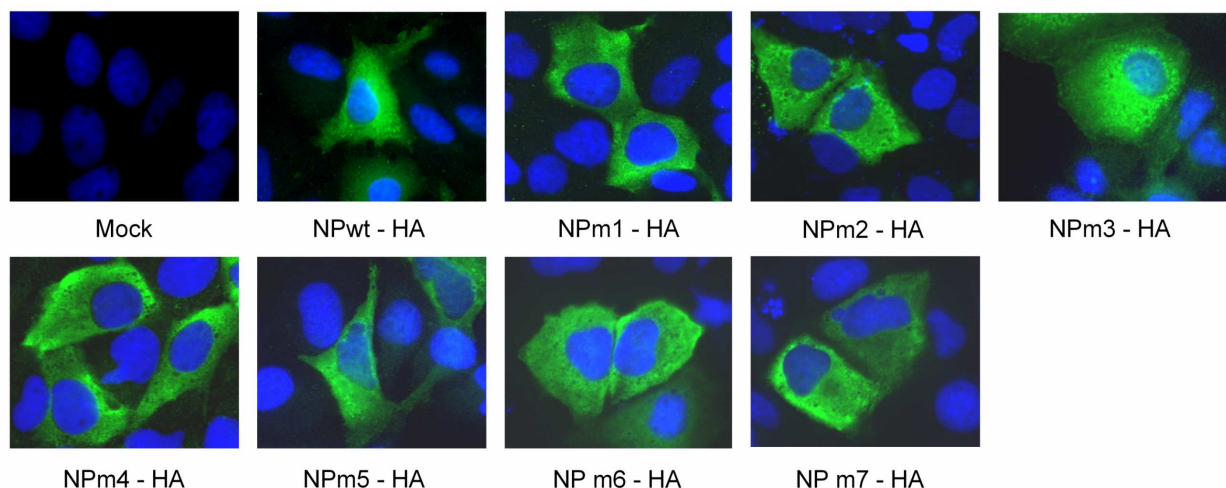


Abb. 24: Intrazelluläre Verteilung der Alanin-Substitutionsmutanten

HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für wildtypisches NP-HA oder verschiedene Alanin-Substitutionsmutanten kodieren. Als Kontrolle wurde leerer pCAGGS-Vektor transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und anschließend mit einem monoklonalen α -HA Antikörper inkubiert. NP wurde daraufhin durch Inkubation mit einem FITC-gekoppelten α -Maus Sekundärantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt.

Die Analyse zeigte, dass alle Mutanten eine diffuse, zytoplasmatische Verteilung aufweisen und sich somit wie wildtypisches NP verhalten (siehe Abb. 24). Dies legt den Schluss nahe, dass die beobachtete Reduktion der NP-NP-Interaktion nicht auf einer unterschiedlichen Lokalisation der Mutanten und des Wildtyp-NPs basiert.

Nachdem die Ko-Immunpräzipitationsstudien ergeben hatten, dass die Alanin-Substitutionsmutanten eine stark herabgesetzte Interaktion mit wildtypischem NP aufweisen (Abb. 23), stellte sich die Frage, ob die Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Oligomerisierung aufweisen. Daher wurde die Oligomerisierung verschiedener Alanin-Substitutionsmutanten sowie der Deletionsmutante NP Δ 1-86 durch Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation bestimmt und mit wildtypischem NP verglichen.

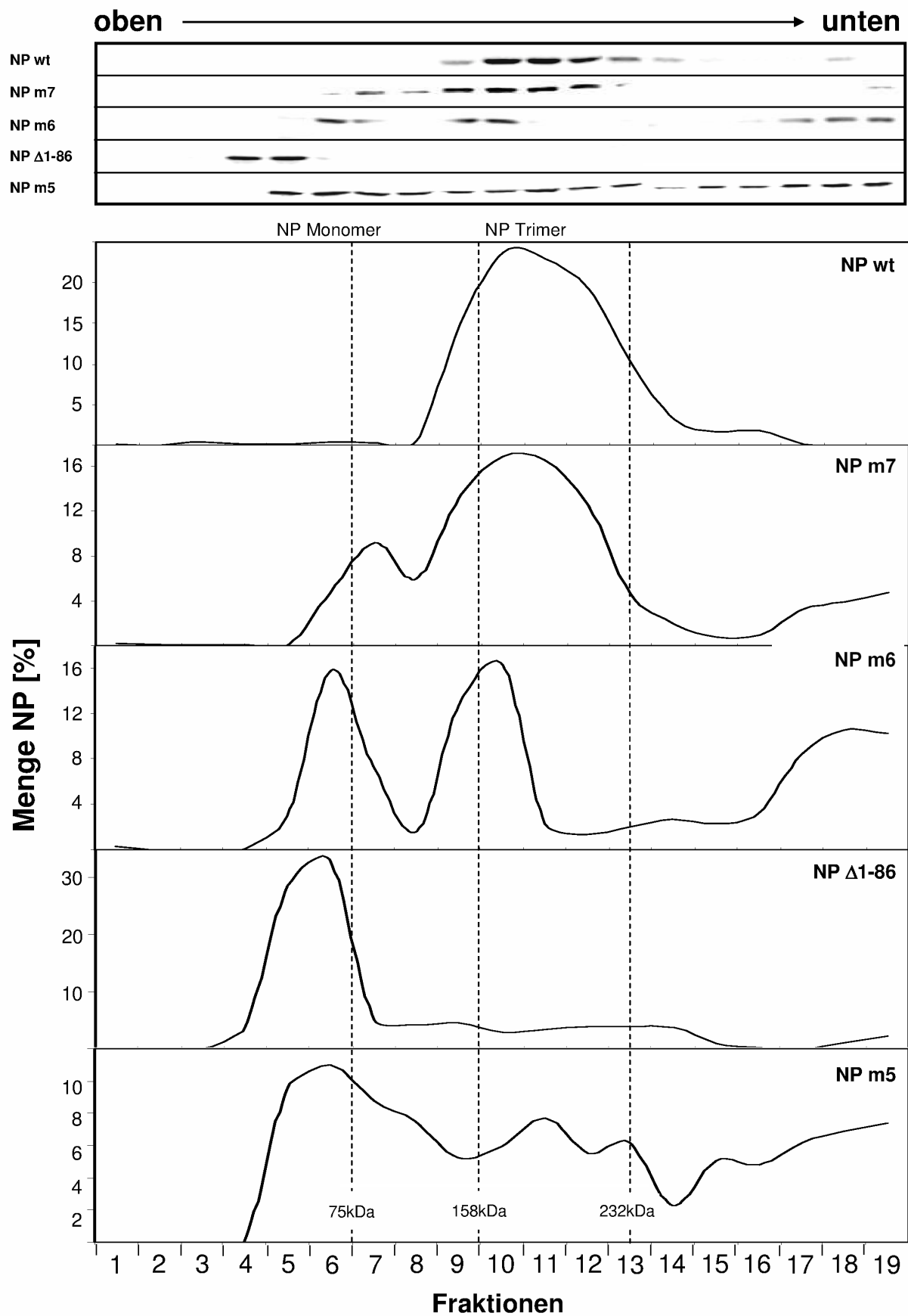


Abb. 25: Oligomerisierung verschiedener NP-Mutanten

HEK293T-Zellen wurden mit einem pCAGGS-Plasmid transfiziert, das für wildtypisches NP-HA, die Deletionsmutante NP Δ 1-86 oder verschiedene Alanin-Substitutionsmutanten kodiert (siehe Abb. 19, Abb. 21 und 22). 48h Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und unlösliche von löslichen Bestandteilen getrennt. Die löslichen Überstände wurden anschließend konzentriert und jeweils auf einen 5 bis 35 %igen Rohrzucker-Gradienten in PBS_{def} überschichtet. Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten in 200 μ l – Fraktionen abgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. NP wurde durch einen monoklonalen α -HA Antikörper detektiert. Parallel wurde ein separater Markergradient mit den Proteinen Conalbumin (75 kDa), Aldolase (158 kDa) und Catalase (232 kDa) zentrifugiert, in 200 μ l Fraktionen aufgeteilt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Die Analyse der Dichtegradientenzentrifugation ergab, dass alle hier aufgeführten Alanin-Substitutionsmutanten ein im Vergleich zum Wildtyp verändertes Oligomerisierungsmuster aufweisen (Abb. 25). Während wildtypisches NP ausschließlich Trimere bildet (entspricht Fraktion 10), liegt die Mutante NP m7 zu ca. 20 % auch als Monomer vor (entspricht Fraktion 6). Ähnlich verhält es sich mit der Mutante NP m6, allerdings lassen sich hier ca. 50% des gesamten Proteins als Monomer finden, während der Rest des Proteins als Trimer vorliegt. Auch die Alanin-Substitutionsmutante NPm5 weist eine derart veränderte Oligomerisierung auf; allerdings sind in diesem Fall neben Monomeren auch andere, nicht näher definierte Oligomere nachzuweisen. Interessanterweise ist die Deletionsmutante NP Δ 1-86, die auch in der Ko-Immunpräzipitation keinerlei Interaktion mit wildtypischem NP aufwies (Abb. 19), gar nicht mehr in der Lage, Oligomere auszubilden und liegt rein als Monomer vor.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die Deletionsmutante NP Δ 1-86 sowie die Alanin-Substitutionsmutanten, bei denen sowohl Aminosäuren im N-terminalen als auch im C-terminalen Teil des NP mutiert wurden, eine reduzierte Fähigkeit zur Interaktion mit wildtypischem NP aufweisen und dass sich dieser Defekt in einem veränderten Oligomerisierungsmuster widerspiegelt. Dies spricht dafür, dass N-terminale aber auch C-terminale Anteile im NP an der Oligomerisierung beteiligt sind. Anhand dieser Mutanten wurde im Weiteren die Funktion der NP-Oligomerisierung analysiert.

4.3 Bedeutung der NP-Oligomerisierung für die biologische Funktion des Nukleoproteins

Für das Nukleoprotein der Arenaviren sind neben der Enkapsidierung des viralen Genoms nach derzeitigem Stand der Erkenntnis drei wesentliche Funktionen bekannt. Diese sind:

- (i) eine Rolle bei der Transkription und Replikation des viralen Genoms (Pinschewer et al., 2003)
- (ii) die Interaktion mit dem viralen Matrixprotein Z (Strecker et al, 2003, Shtanko et al, 2010, Livingston MacLeod et al, 2011, Ortiz-Riano et al, 2011)
- (iii) die Inhibition der zellulären Interferon-Antwort (Martinez-Sobrido et al., 2007; Qi et al., 2010)

Über die Bedeutung der Oligomerisierung des Nukleoproteins für diese Prozesse ist hingegen nichts Näheres bekannt. Aus diesem Grund wurde die biologische Funktion der NP-Oligomerisierung untersucht. Dazu wurden NP-Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, homotypische NP-NP-Interaktionen einzugehen, hinsichtlich ihrer Funktionalität bei den oben beschriebenen Prozessen analysiert.

4.3.1 Funktionalität der NP-Alanin-Substitutionsmutanten und der Mutante NP Δ 1-86 bei der Replikation des Lassavirus Minigenoms

Die Alanin-Substitutionsmutanten NPm2, NPm3 und NPm5 bis NPm7 zeigen eine stark reduzierte NP-NP-Interaktion in der Ko-Immunpräzipitation (siehe 4.2.3). Daher wurde überprüft, wie sich diese Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-NP bei der Replikation des Lassavirus-Genoms verhalten. Für diese Untersuchung wurde das Replicon-System für das Lassavirus verwendet⁵ (Hass et al., 2004)

Das Replikon-System basiert auf der Tatsache, dass die minimalen Faktoren zur Replikation des Lassavirus Genoms die virale Polymerase und das Nukleoprotein NP sind (Hass et al., 2004). Im Falle des Replicon-System wird ein Minigenom verwendet, welches auf der *Rennilla*-Luciferase als Reporter für die Transkription und Replikation des Genoms basiert. Das Gen für die Luciferase wurde zwischen die regulatorischen Elemente der 3' und 5' untranslatierten Bereiche sowie der intergenischen Region des S-Segmentes des Lassavirus kloniert. Zusätzlich wurden ein T7-Promotor sowie ein T7-Terminator eingefügt. Dies ermöglicht die *in vitro*-Produktion sog. „run-off – Minigenome“ durch die T7-Polymerase (siehe Abb. 26A).

5: Die Herstellung der Mutanten erfolgte in Marburg, der Test im Replicon-System wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Stephan Günther von Frau Dipl. Biol. Maria Lehmann am Hamburger Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin durchgeführt

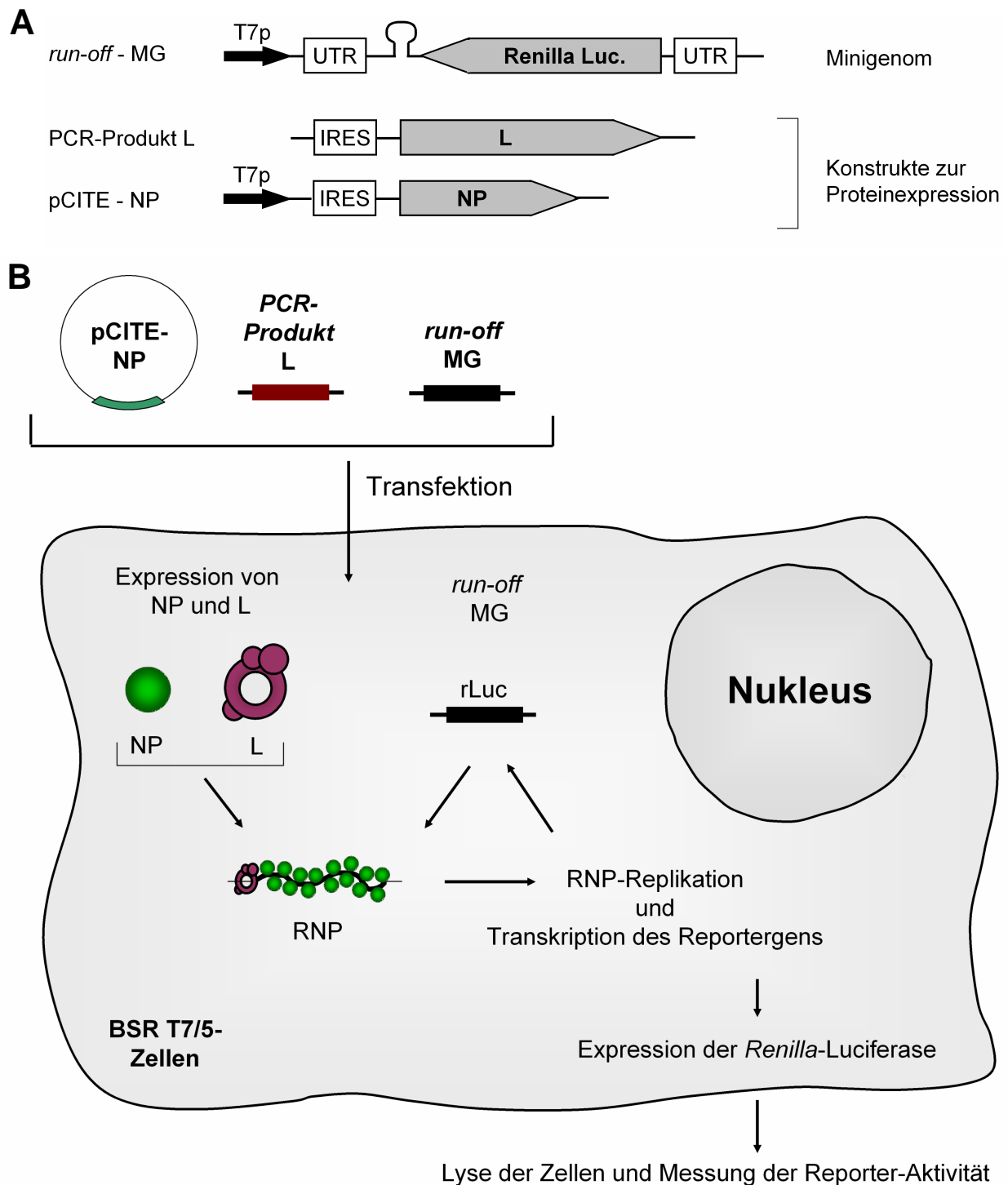


Abb. 26: Prinzip des Replicon-Systems

(A) Schematische Darstellung der für das Minigenom verwendeten Konstrukte. Modifiziert nach (Hass et al., 2004). (B) Schematische Darstellung des Replicon-System. Modifiziert nach Günther und Lenz, 2004. BSR T7/5-Zellen werden mit Konstrukten transfiziert, die für NP und L kodieren. Dazu wird ein *run-off* – Transkript des Minigenoms transfiziert. In der Zelle kommt zur Bildung von RNP-Komplexen aus NP, L und dem Minigenom. Nur wenn NP und L funktionell sind, wird das Minigenom repliziert und das Reportergen transkribiert. Die Reporteraktivität kann nach Lyse der Zellen gemessen werden und ist ein Maß für die Transkription und Replikation des Minigenoms. Abkürzungen: MG = Minigenom, IRES = internal ribosomal entry site, T7p = T7-Promotor, UTR = untranslatierte region, rLuc = *Renilla*-Luciferase

Diese *run-off*-Minigenome werden zusammen mit Plasmiden transfiziert, die für die virale Polymerase L sowie das NP unter Kontrolle des T7-Promotors kodieren (siehe Abb. 26B). Zur Normalisierung der erhaltenen Signale wird zudem ein Plasmid transfiziert, das für eine *Firefly*-Luciferase kodiert.

In der Zelle kommt es dann zur Enkapsidierung des Minigenoms. Das Reportergen, die *Renilla*-Luciferase wird allerdings nur dann exprimiert, wenn zusätzlich auch die Replikation und Transkription des Minigenoms stattfindet. Die Aktivität der Luciferase ist in diesem System also ein Maß für die Replikation und Transkription und somit auch für die Funktionalität der viralen Polymerase und des Nukleoproteins.

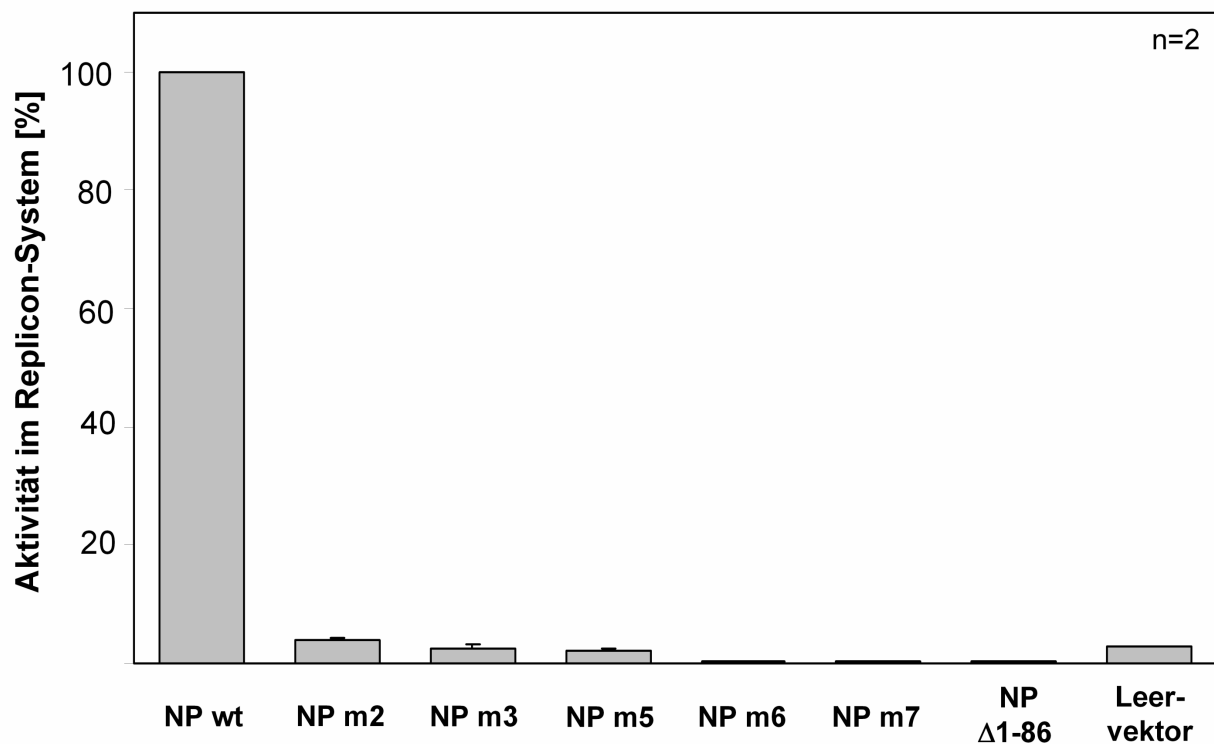


Abb. 27: Aktivität der Alanin-Substitutionsmutanten und der Mutante NP Δ 1-86 im Lassavirus Replicon-System

BSR T7/5-Zellen wurden mit einem PCR-Produkt transfiziert, das für die virale Polymerase L kodiert. Mit diesem Plasmid wurden weiterhin *run-off*-Transkripte des Lassavirus-Minigenoms transfiziert. Zusätzlich wurden pCITE-Plasmide ko-transfiziert, die für wildtypisches NP-HA, verschiedene Alanin-Substitutionsmutanten oder die Mutante NP Δ 1-86 kodieren (siehe Abb. 19, 21 und 22). Als Kontrolle wurde Leervektor (pCITE-Plasmid) ko-transfiziert. Zur Normalisierung wurde zudem jedem Transfektionsansatz ein pCITE-Plasmid hinzugefügt, welches für die Firefly-Luciferase unter Kontrolle eines T7-Promotors codiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Reporteraktivität gemessen. Versuch durchgeführt von Dipl. Biol. Maria Lehmann.

Bei Verwendung der Alanin-Substitutionsmutanten im Replicon-System zeigte sich, dass die Mutation der hydrophoben Aminosäuren innerhalb beider Helices, $\alpha 4$ und $\alpha 5$, zu einer drastisch verminderten Reportergen-Aktivität im Vergleich mit wildtypischem NP-HA führt (Abb. 27). Gleiches gilt für die Mutanten NPm6 und NPm7. Auch die Deletionsmutanten NP $\Delta 1-86$ zeigt keinerlei Aktivität im Replicon-System. Dies weist darauf hin, dass die Mutanten nicht mehr länger in der Lage sind, die Replikation und Transkription des Lassavirus-Minigenoms zu vermitteln und somit einen Defekt hinsichtlich ihrer Aktivität bei diesen Prozessen aufweisen. Diese Ergebnisse lassen folglich den Schluss zu, dass die NP-NP-Interaktion für die Replikation und Transkription des Lassavirus-Genoms von entscheidender Bedeutung ist.

4.3.2 Einbau von NP Alanin-Substitutionsmutanten und der Mutante NP $\Delta 1-86$ in Z-induzierte VLPs

Das virale Matrixprotein Z ist die treibende Kraft bei der Freisetzung infektiöser Virionen. Es interagiert mit dem viralen Glykoprotein GP und dem Nukleoprotein NP und fungiert so als „Brücke“ zwischen der Virushülle dem Ribonukleokapsidkomplex (Eichler et al., 2004; Schlie et al., 2010a). Bei Einzelexpression bildet das Matrixprotein Virus-ähnliche Partikel (VLPs), welche aus dem Überstand Z-exprimierender Zellen isoliert werden können (Strecker et al., 2003). Durch eine Ko-Expression von Z und NP wird letzteres zudem in diese VLPs inkorporiert (Eichler et al., 2004; Schlie et al., 2010a). Dieser Einbau findet aufgrund der spezifischen Interaktion zwischen NP und Z statt; bei fehlender Interaktion kann das NP daher nicht mehr in Z-induzierte VLPs eingebaut werden.

Um die Rolle der NP-NP-Interaktion für die Interaktion zwischen dem Matrixprotein Z und dem NP zu überprüfen, wurden daher das Z-Protein und jeweils einzelne der Alanin-Substitutionsmutanten oder die Deletionsmutante NP $\Delta 1-86$ in HEK293T-Zellen ko-exprimiert, die VLPs aus dem Überstand isoliert und hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung analysiert.

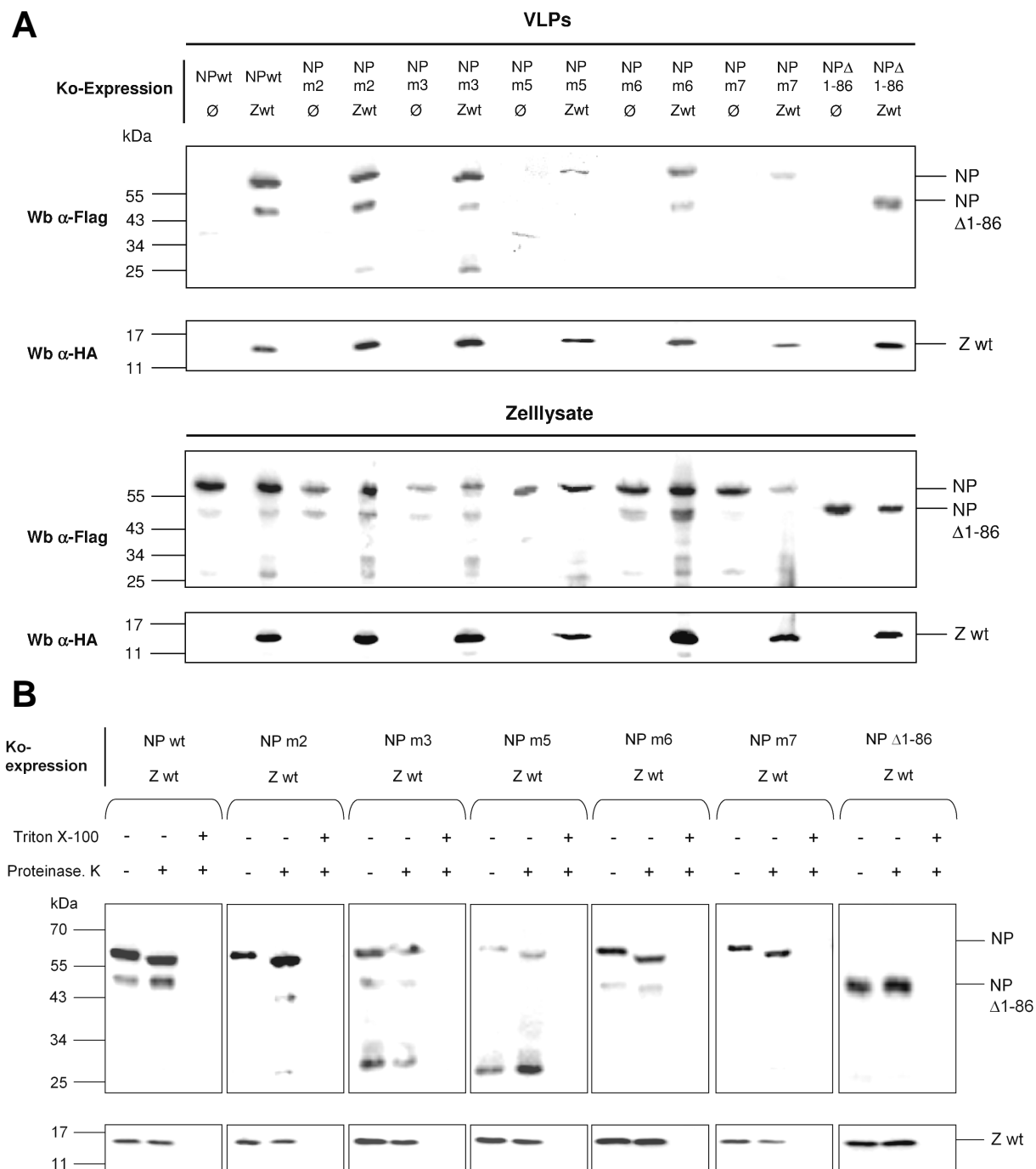


Abb. 28: Einbau von Alanin-Substitutionsmutanten und der Mutante NPΔ1-86 in Z-induzierte VLPs

(A) HEK293T-Zellen wurden mit einem pCAGGS-Plasmid transfiziert, das für wildtypisches Z-HA kodiert. Dazu wurden pCAGGS-Plasmide ko-transfiziert, die für wildtypisches NP-HA, verschiedene Alanin-Substitutionsmutanten oder die Deletionsmutante NPΔ1-86 kodieren (siehe Abb. 19, 21 und 22). 48 h nach der Transfektion wurde der Mediumüberstand abgenommen und die enthaltenen VLPs isoliert. Als Kontrolle wurde eine Probe der Zelllysate in 4x Probenpuffer aufgenommen. Die resuspendierten VLPs und die Zelllysate wurden daraufhin mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem monoklonalen α-HA Antikörper analysiert. Wb = Western Blot. **(B)** Die VLPs wurden in drei Fraktionen zu je 20µl aufgeteilt und mit Proteinase K in An- oder Abwesenheit von Triton X-100 behandelt. Anschließend wurden die Ansätze mit 4x Probenpuffer versetzt, mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert mit einem monoklonalen α-HA Antikörper analysiert.

Sowohl alle Substitutionsmutanten als auch die Deletionsmutante NP Δ 1-86 wurden in Z-induzierte VLPs inkorporiert (Abb. 28). Ein Vergleich mit dem wildtypischen NP zeigt zudem, dass der Einbau der NP-Mutanten mit Ausnahme der Mutanten NPm5 auch quantitativ mit der Wildtyp-Situation vergleichbar ist. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Mutationen in den Helices α 4 und α 5 oder an den Aminosäuren R52 und D500 keinen signifikanten Einfluss auf die Interaktion des Nukleoproteins mit dem Matrixprotein haben und somit die korrekte Trimerisierung des NP keine Voraussetzung für die NP-Z-Interaktion ist.

4.3.3 Inhibition der zellulären Interferon-Antwort durch Alanin-Substitutionsmutanten und die Mutante NP Δ 1-86

Das Nukleoprotein des Lassavirus ist in der Lage, die zelluläre Typ I Interferon-Antwort zu inhibieren (Martínez-Sobrido et al., 2009), die in vielen Fällen bei einer Virusinfektion hochreguliert wird. Diese Funktion wird durch eine 3' - 5' - Exonuklease vermittelt, die sich im C-terminalen Teil des Nukleoproteins befindet (Hastie et al., 2011a; Qi et al., 2010). Ob allerdings die NP-NP-Interaktion für diese Funktion Voraussetzung ist, oder ob die Fähigkeit zur Inhibition der Typ I Interferon-Antwort unabhängig von homotypischen NP-Interaktionen ist, war zu Beginn dieser Arbeit unklar. Aus diesem Grund wurden die Alanin-Substitutionsmutanten des NP in einem Interferon-Induktionsnachweis eingesetzt⁶.

Dieses Verfahren basiert auf einem Plasmid, welches für die *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle des Interferon β -Promotors kodiert. Bei Stimulierung der Zellen z.B. durch die virale RNA des vesikulären Stomatitis Virus, die als starker Induktor der Interferon-Antwort bekannt ist (Kato et al., 2006), wird die Expression von Interferon und somit auch der *Firefly*-Luciferase über den Interferon β -Promotor hochreguliert. Die Aktivität der Luciferase im Zelllysats kann dann gemessen werden und dient als Maß für die Hochregulation der Interferon-Antwort. Durch gleichzeitige Expression verschiedener Proteine kann dann deren potentielle Eigenschaft als Inhibitor dieser Interferon-Antwort überprüft werden (siehe Abb. 29).

6: Dieser Nachweis wurde in Kooperation mit Dr. Thomas Hoenen (NIH, Rocky Mountain Laboratories) durchgeführt.

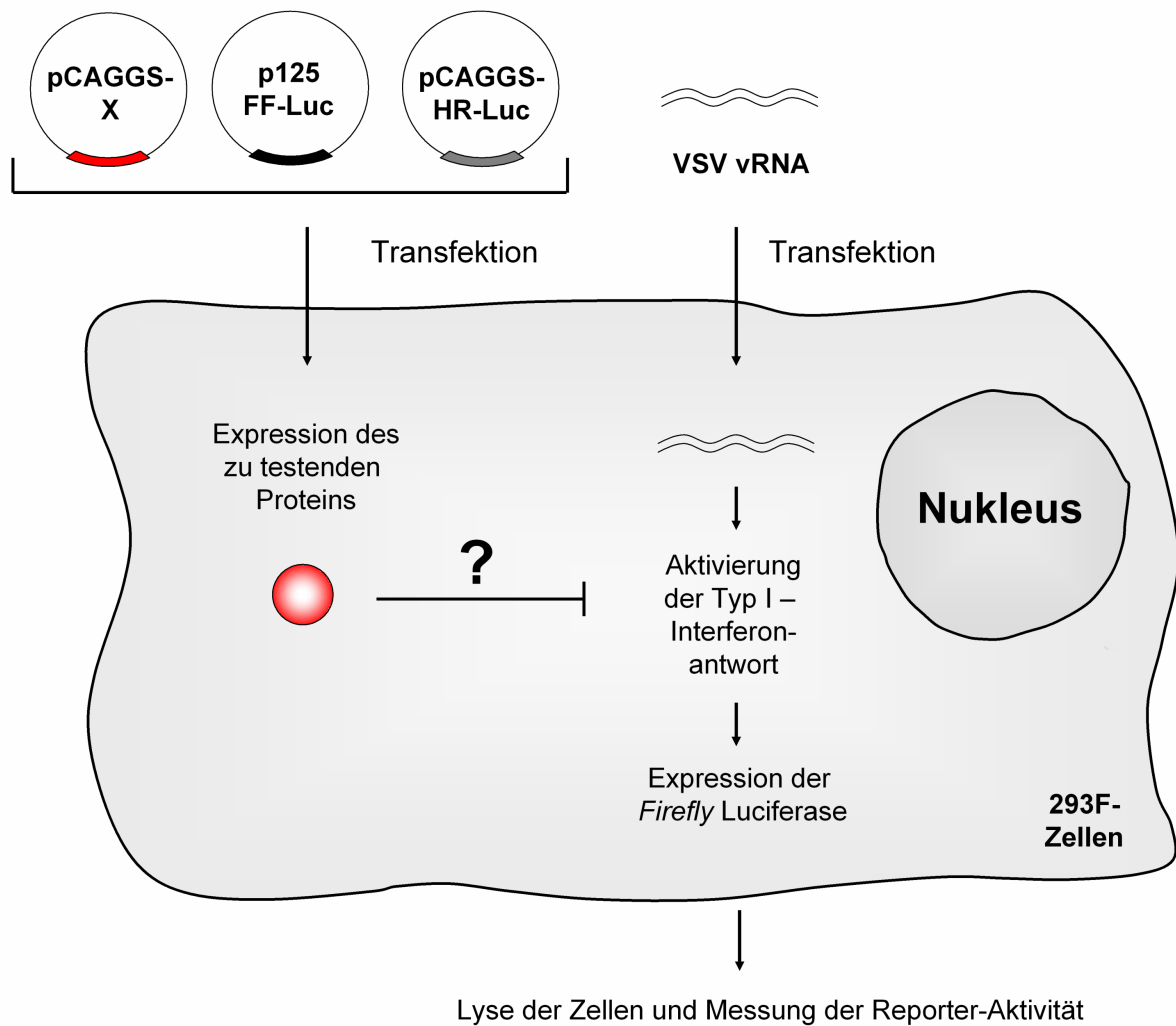


Abb. 29: Prinzip des Interferon-Induktionsnachweises

Schematische Darstellung des Interferon Induktions-Nachweis. X bezeichnet das auf seine Aktivität als Inhibitor der Typ I Interferon-Antwort zu testende Protein X. Zusammen mit einem Plasmid, welches für dieses Protein kodiert (pCAGGS-X), werden die Plasmide ko-transfiziert, die für die *Renilla*-Luciferase (pCAGGS-HR-Luc) sowie die *Firefly*-Luciferase (p125 FF-Luc) kodieren. Werden die Zellen nun mit vRNA des VSV transfiziert, kommt es zur Expression der *Firefly*-Luciferase, die als Reportergen unter Kontrolle des Interferon β -Promotors steht. Wenn das Protein X die Aktivierung der Typ I – Interferonantwort hemmen kann, unterbleibt die Expression der *Firefly*-Luciferase. Abkürzungen: VSV = Vesikuläres Stomatitis Virus; FF-luc = *Firefly*-Luciferase; HR-Luc = *Renilla*-Luciferase

Neben den Alanin-Substitutionmutanten wurden auch Plasmide eingesetzt, die für die Deletionsmutante NP Δ 1-86 oder wildtypisches NP bzw. NP-HA kodieren. Dadurch sollte ein direkter Vergleich zwischen den Mutanten und Wildtyp-NP hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Interferon-Induktion ermöglicht werden. Als Kontrollen dienten leerer pCAGGS Vektor sowie das VP35 des Ebolavirus, das als starker Inhibitor der Interferon-Antwort bekannt ist (Basler et al., 2000).

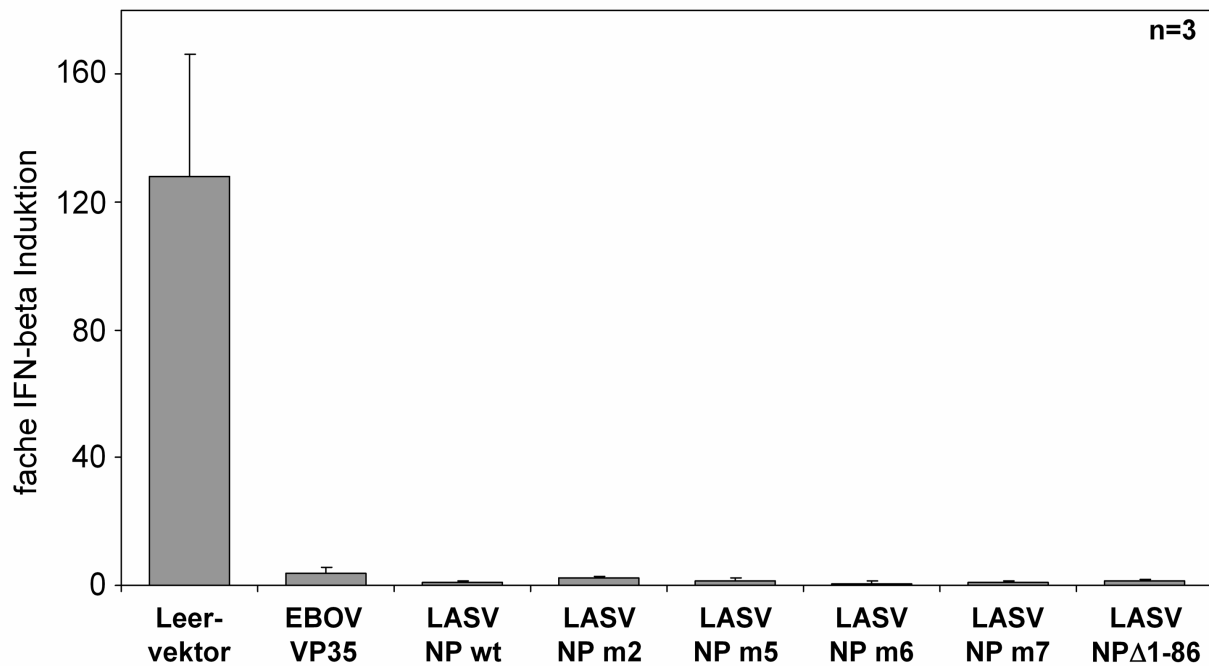


Abb. 30: Inhibition der zellulären Interferon-Antwort durch Alanin-Substitutionsmutanten und die Mutante NPΔ1-86

HEK293FR-Zellen wurden mit den Plasmiden pi125luc und pCAGGS-HR-Luc (siehe 3.4.15) transfiziert. Zusammen mit diesen Konstrukten wurden pCAGGS-Plasmide ko-transfiziert, die entweder für wildtypisches NP bzw. NP-HA, verschiedene Alanin-Substitutionsmutanten oder die Mutante NPΔ1-86 kodieren (siehe Abb. 19, 21 und 22). Als Kontrolle wurden pCAGGS-VP35 oder leerer pCAGGS-Vektor ko-transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Induktion der Interferon-β Expression mit 1 µg VSV-vRNA transfiziert und nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert und die Reporteraktivität der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase gemessen. Diese Versuchsreihe wurde von Dr. Thomas Hoenen durchgeführt.

Das Ergebnis dieses Versuches bestätigte die Funktion des Lassavirus NP als Inhibitor der Typ I - Interferon-Antwort (Abb. 30, NPwt). Weiterhin zeigte sich, dass sowohl Mutationen der kritischen Leucine und Valine innerhalb der Helix α_4 als auch der Helix α_5 sowie der Aminosäuren R52 und D500 keinen nennenswerten Einfluss auf diese Funktion haben (Abb. 30). Diese Beobachtung zeigt, dass die homotypische NP-NP-Interaktion keine Voraussetzung für die Eigenschaft des NP als Inhibitor der Typ I-Interferon-Antwort ist.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Oligomerisierung des NP für Replikation und Transkription des viralen Genoms von essentieller Bedeutung ist. Im Gegensatz dazu spielt sie für die Interaktion mit dem Z-Protein und die Inhibition der Typ I – Interferonantwort keine Rolle. Nachdem nun die NP-Oligomerisierung charakterisiert und ihre Bedeutung für die biologischen Funktionen des NP geklärt war, wurde im nächsten Schritt die Interaktion zwischen dem NP und dem Matrixprotein Z untersucht.

4.4 Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und dem Matrixprotein Z

Eine wesentliche Eigenschaft des Nukleoproteins ist die Interaktion mit dem Matrixprotein Z. Diese Interaktion spielt im viralen Replikationszyklus eine entscheidende Rolle (siehe 1.3.1). Über die genaue Art der molekularen Interaktion zwischen NP und Z ist für das Lassavirus jedoch nichts bekannt. Es stellte sich daher die Frage, welche Domänen innerhalb des Nukleoproteins die Wechselwirkung dieser beiden Proteine vermitteln und ob sich diese Domänen mit bereits bekannten, funktionellen Domänen wie z.B. der 3'-5'- Exonuklease überschneiden.

4.4.1 Interaktion von NP-Deletionsmutanten mit wildtypischem Z-Protein

Zur Untersuchung der NP-Z-Interaktion wurde wildtypisches Z-Protein auf Genebene mit einem C-terminalen HA- oder Flag-tag versehen⁷ (Abb. 31A). Diese Konstrukte wurden mit den bereits zur Untersuchung der NP-NP-Interaktion verwendeten Deletionsmutanten NPΔ1-312 und NPΔ455-569 (siehe Abb. 31B) ko-exprimiert. Als Kontrollen dienten Wildtyp-Z und wildtypisches NP sowie die Einzelexpression von Wildtyp-Z. Die Interaktion der Proteine wurde anschließend durch Ko-Immunpräzipitationsstudien analysiert.

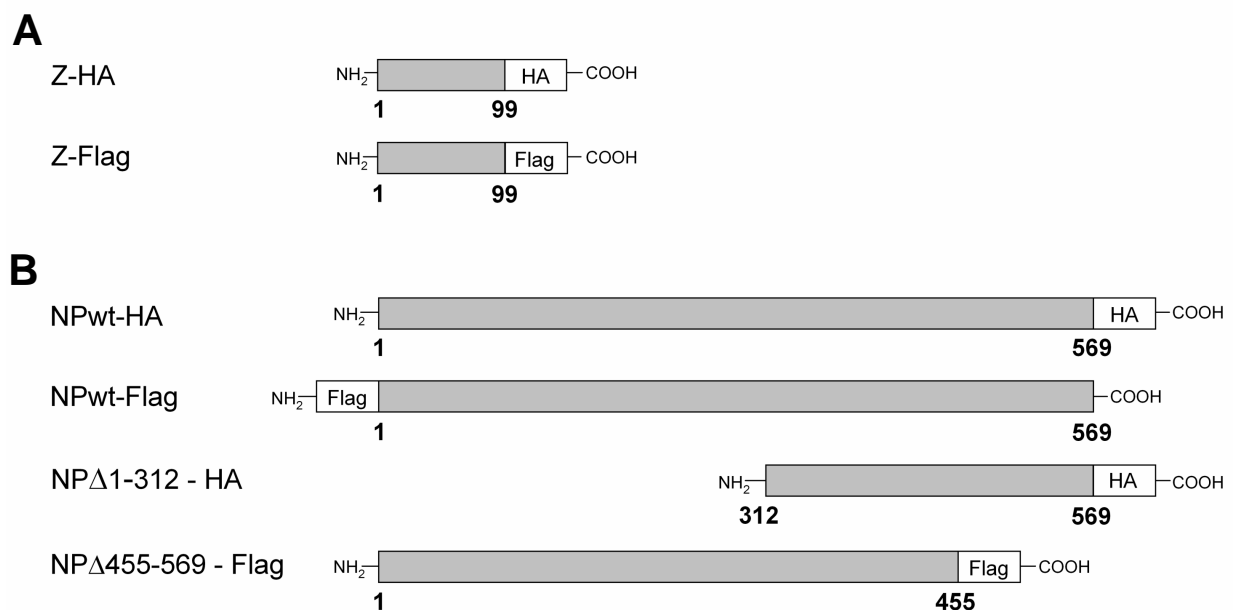


Abb. 31: Konstrukte zur Untersuchung der NP-Z-Interaktion

Schematische Abbildung der zur Untersuchung der NP-Z-Interaktion verwendeten **(A)** Z- bzw. **(B)** NP - Konstrukte. Zur Detektion und Fällung wurde den Proteinen auf Genebene ein HA- oder Flag-tag angefügt.

7: Diese Konstrukte wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Strecker

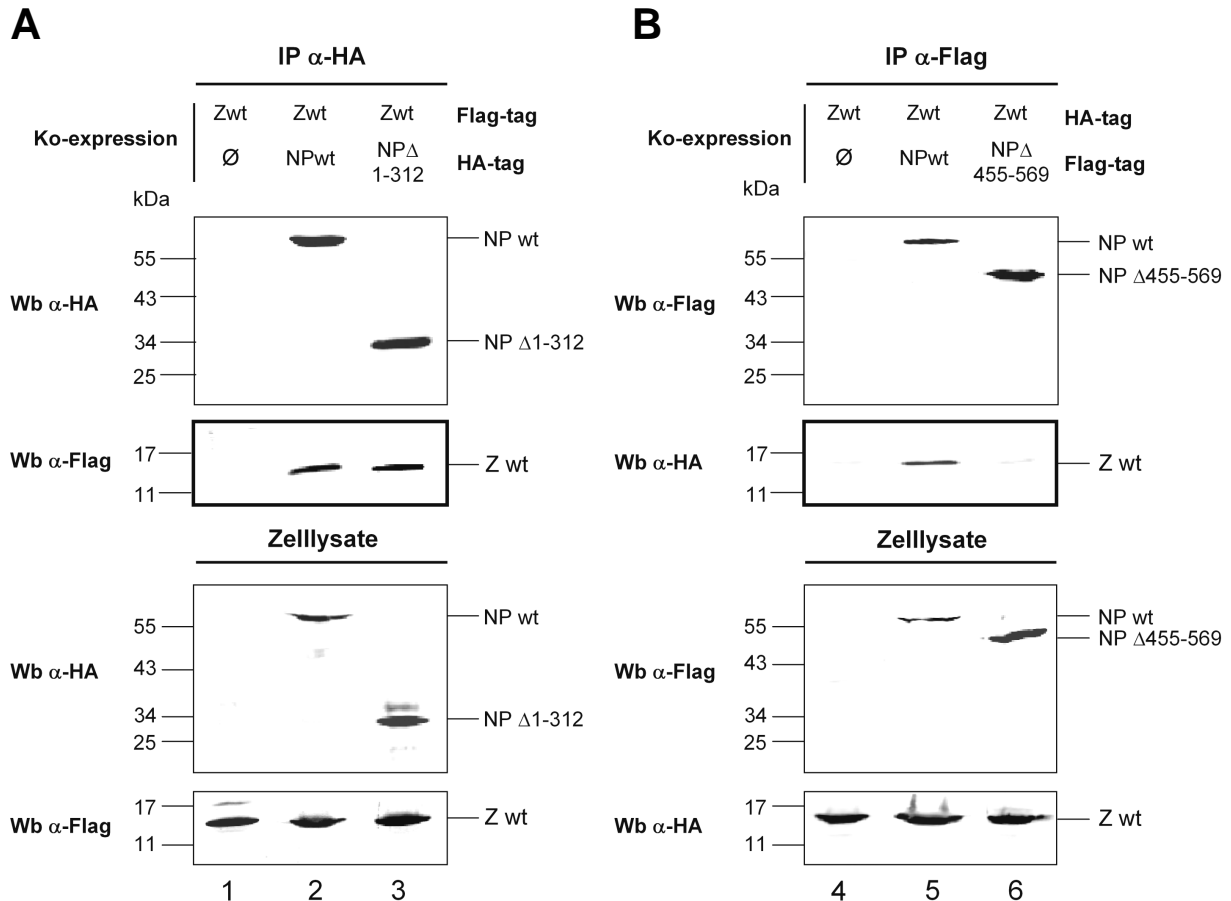


Abb. 32: Interaktion von NP-Wildtyp und NP-Deletionsmutanten mit wildtypischem Matrixprotein

(A) und (B) HEK293T-Zellen wurden mit einem pCAGGS-Plasmid transfiziert, das für wildtypisches Z-Flag (B) oder Z-HA (C) kodiert. Zusammen mit diesem Plasmid wurden pCAGGS-Plasmide ko-transfiziert, die für wildtypisches NP-HA bzw. die Mutante NP Δ 1-312 (B) oder wildtypisches NP-Flag bzw. NP Δ 455-569 (C) kodieren (siehe Abb. 31). Als Kontrolle wurde das Z-Protein alleine verwendet. 48h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und einer Ko-Immunpräzipitation unter Verwendung eines monoklonalen α -HA (B) oder α -Flag (C) – Antikörpers unterzogen. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde zudem jeweils eine Probe der Zelllysate in 4x Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Proteine wurden mit polyklonalen α -HA bzw. α -Flag – Antikörpern detektiert. Wb = Western Blot.

Dabei zeigte sich, dass eine N-terminale Deletion von bis zu 312 Aminosäuren keinerlei Einfluss auf die Interaktion zwischen NP und Z hatte (Abb. 32A, Spur 3), während die Deletion der letzten 114 Aminosäuren des C-terminalen Proteinbereichs dazu führte, dass die Interaktion beider Proteine stark herabgesetzt wurde (Abb. 32B, Spur 6). Daher kann vermutet werden, dass die Aminosäuren 455-569 essentiell für die Vermittlung der NP-Z-Interaktion sind.

Nachdem durch die Ko-Immunpräzipitationsstudien gezeigt wurde, dass der C-Terminus bei der NP-Z-Interaktion eine große Rolle spielt, wurde untersucht, ob sich die fehlende Interaktion zwischen NP und Z auch bei der Freisetzung des NP in Z-induzierte virusähnliche Partikel auswirkt.

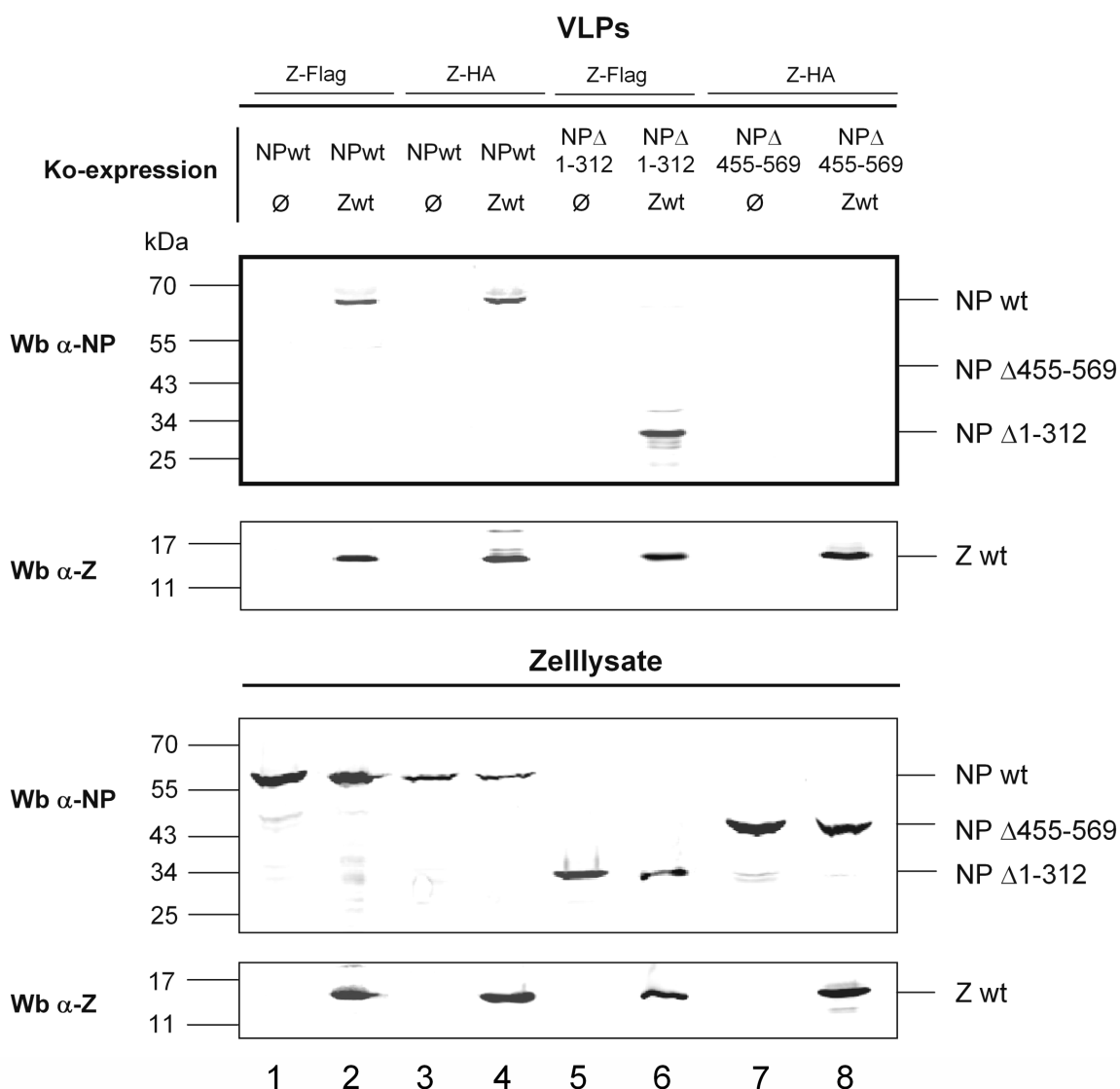
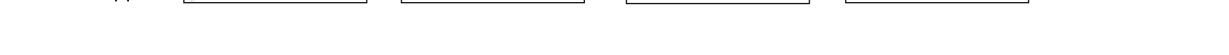


Abb. 33: Einbau von NP-Wildtyp und NP-Deletionsmutanten in Z-induzierte VLPs

HEK293T-Zellen wurden mit pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für wildtypisches Z-HA bzw. Z-Flag kodieren. Zusammen mit diesen Konstrukten wurden pCAGGS-Plasmide ko-transfiziert, die für wildtypisches NP-HA oder NP-Flag bzw. die Deletionsmutanten NPΔ1-312 oder NPΔ455-569 kodieren (siehe Abb. 31). Als Kontrolle wurden die NP-Konstrukte alleine transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen, die enthaltenen VLPs isoliert und in 100 µl PBS_{def} resuspendiert. 20 µl dieser VLPs wurden in 4x Probenpuffer aufgenommen und zusammen mit einer Probe der Zellysate als Expressionskontrolle mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Die Detektion der Proteine erfolgte über einen monoklonalen α-HA bzw. einen polyklonalen α-Flag – Antikörper. Wb = Western Blot.



Die in Abb. 22 beschriebenen V/L-Präparate wurden in drei Fraktionen zu je 20 µl aufgeteilt und mit Proteinase K

312 in lipidumhüllten Vesikeln befinden (Abb. 34). Das Z-Protein sowie das NP sind vor dem Verdau durch Proteinase K geschützt. Erst durch Zugabe des Detergenz Triton X-100 können beide Proteine degradiert werden, da in diesem Fall die schützende Lipidhülle der virusähnlichen Partikel zerstört wird (Abb. 34). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Mutante NPΔ1-312 ähnlich wie wildtypisches NP in Z-induzierte VLPs eingebaut wird.

Die Versuche bestätigen die für Ko-Immunpräzipitationsstudien gemachten Beobachtungen und zeigen, dass die letzten 114 C-terminalen Aminosäuren für die Interaktion zwischen dem NP und dem Matrixprotein von großer Bedeutung sind.

4.4.2 Eingrenzung der für die NP-Z-Interaktion kritischen Aminosäurebereiche innerhalb des NP

Die Versuche mit NP-Deletionsmutanten deuteten darauf hin, dass der C-Terminus bei der Vermittlung der NP-Z-Interaktion eine wichtige Rolle spielt. Daher wurden die dafür verantwortlichen Aminosäurebereiche innerhalb der letzten 114 C-terminalen Aminosäuren näher eingegrenzt. Zu diesem Zweck wurden weitere Deletionsmutanten hergestellt und die Interaktion dieser Mutanten mit dem Z-Protein analysiert.

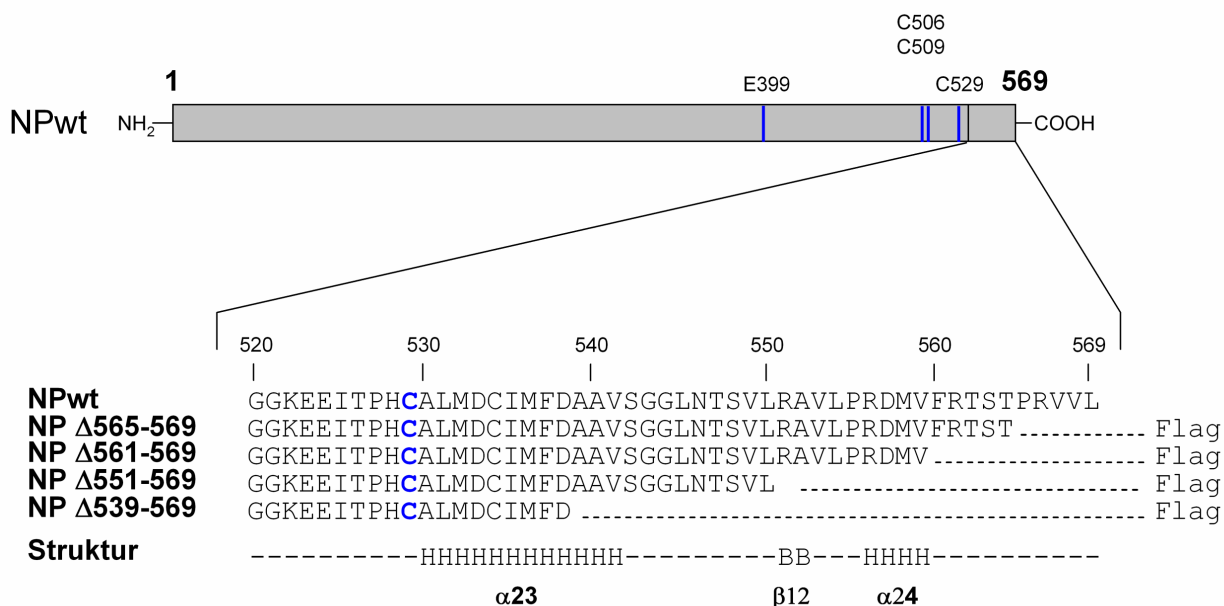


Abb. 35: C-terminale Deletionsmutanten zur genauen Untersuchung der NP-Z-Interaktion

Schematisch abgebildet ist die Lage der an der Bildung eines atypischen Zink-Fingers beteiligten Aminosäuren (blaue Linien) innerhalb des NPs. Das Cystein 529 ist in der Aminosäuresequenz blau hervorgehoben. Gestrichelte Linien zeigen die in den jeweiligen Mutanten deletierten Bereiche an. Allen Mutanten wurde auf Genebene ein Flag-Tag angefügt. Die durch *in silico*-Analyse⁸ ermittelte Sekundärstruktur ist unterhalb der Aminosäuresequenz abgebildet (H= α-Helix, B = β-Faltblatt).

Die C-terminale Proteindomäne des NP des Lassavirus enthält einen atypischen, konservierten Zink-Finger aus den Aminosäuren E399, C506, C509 und C529. Dieses Motiv dient möglicherweise dem Strukturhalt des Proteins. Daher wurde bei der Klonierung weiterer Deletionsmutanten darauf geachtet, dass der konservierte Zink-Finger erhalten bleibt, um mögliche Strukturänderungen so gering wie möglich zu halten. Basierend auf der Sekundärstrukturvorhersage für das NP wurden dann verschieden große Bereiche C-terminal von der mutmaßlichen Zink-Finger Struktur deletiert (Abb. 35). Allen Mutanten wurde zur Detektion und Fällung ein C-terminaler Flag-tag auf Genebene angefügt. Die Interaktion dieser Mutanten mit wildtypischem Z-Protein wurde mittels Ko-Immunpräzipitationsstudien analysiert.

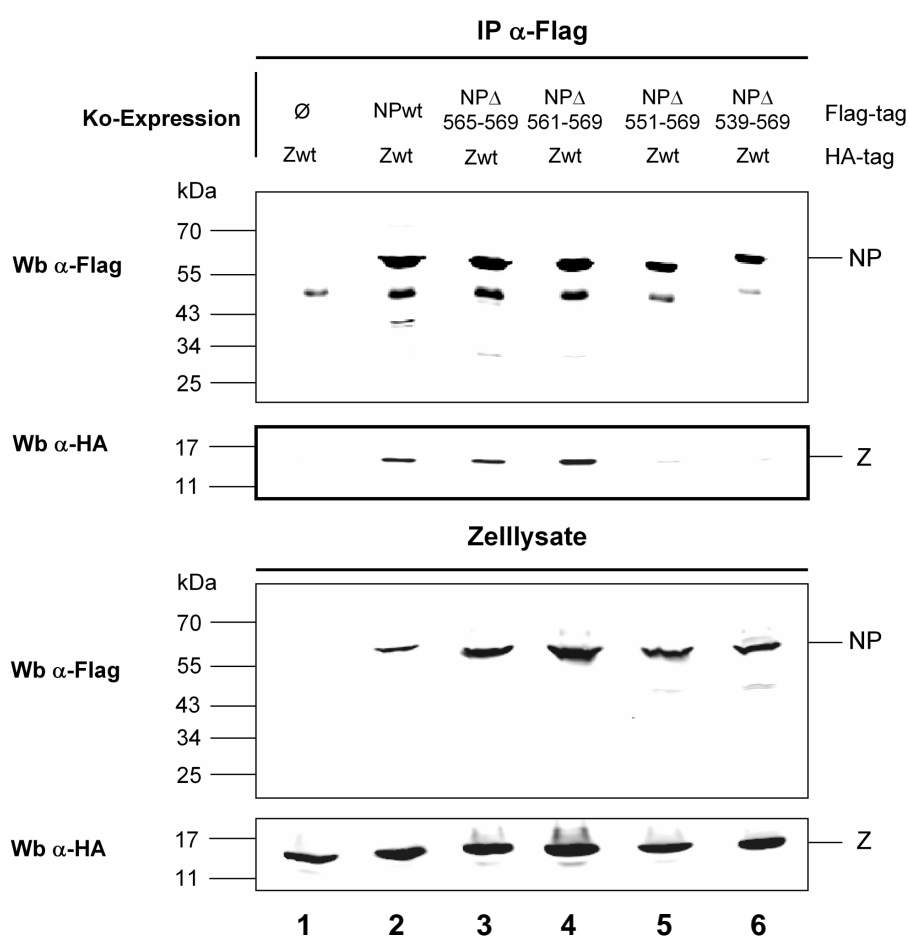


Abb. 36: Interaktion von NP-Wildtyp und C-terminalen NP-Deletionsmutanten mit wildtypischem Matrixprotein

HEK293T-Zellen wurden mit einem pCAGGS-Plasmid transfiziert, das für wildtypisches Z-HA kodiert. Zusammen mit diesem Plasmid wurden pCAGGS-Plasmide ko-transfiziert, die für wildtypisches NP-Flag oder verschiedene Deletionsmutanten kodieren (siehe Abb. 35). Als Kontrolle wurde pCAGGS-Z alleine transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und einer Ko-Immunpräzipitation unter Verwendung eines monoklonalen α -Flag – Antikörpers unterzogen. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde eine Probe der Zelllysate in 4x Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Proteine wurden mit polyklonalen α -HA bzw. α -Flag – Antikörpern detektiert. Wb = Western Blot.

Im Vergleich mit wildtypischem NP führt bereits die Deletion der letzten 19 C-terminalen Aminosäuren zu einer signifikanten Reduktion der NP-Z-Interaktion (Abb. 36, Vgl. Spur 2 und 5). Die Deletion weiterer Aminosäuren ausgehend vom C-Terminus führt ebenfalls zu einer stark herabgesetzten Interaktion mit dem Z-Protein (Abb. 36, Spur 6). Die im Zelllysats nachgewiesenen Proteinmengen der entsprechenden Mutanten sind dabei mit wildtypischem NP vergleichbar (Abb. 36, Zelllysats, Spuren 2, 5 und 6). Der beobachtete Effekt lässt sich also nicht auf Unterschiede im Expressionsniveau zurückführen.

Im Gegensatz dazu verhalten sich die Mutanten, bei denen nur 5 bzw. 10 Aminosäuren des C-Terminus entfernt wurden (siehe Abb. 35) hinsichtlich der Interaktion mit dem Z-Protein wie Wildtyp-NP (Abb. 36, Spuren 2, 3 und 4). Die Interaktion zwischen dem NP und dem Matrixprotein scheint durch die Deletion dieser Aminosäuren also nicht maßgeblich beeinflusst zu werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die letzten 19 C-terminalen Aminosäuren für die Interaktion des NP mit dem Matrixprotein von großer Bedeutung sind. Sie bestätigen darüber hinaus die Beobachtung, dass die C-terminale Domäne des NP von zentraler Bedeutung für die NP-Z-Interaktion ist.

Die Interaktion zwischen dem NP und dem Matrixprotein des Lassavirus findet im Zytoplasma transfizierter Zellen statt. Es stellt sich daher die Frage, ob die starke Reduktion dieser Interaktion auf einer andersartigen Verteilung der entsprechenden Mutanten basiert. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die zelluläre Verteilung der C-terminalen Deletionsmutanten mittels Immunfluoreszenz untersucht und mit wildtypischem NP verglichen.

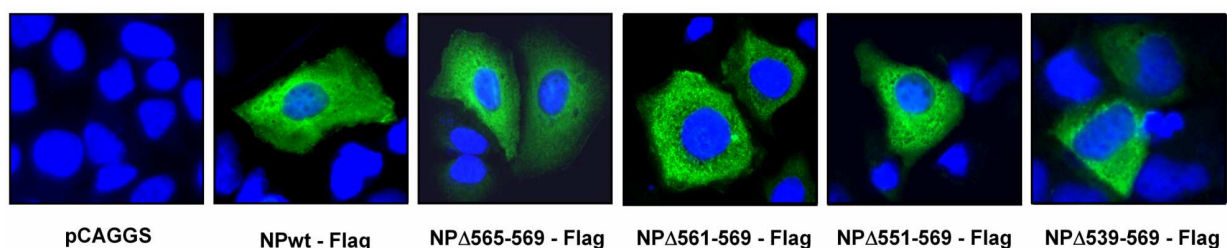


Abb. 37: Intrazelluläre Verteilung der C-terminalen Deletionsmutanten

HuH7 Zellen wurden mit pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für wildtypisches NP-Flag oder verschiedene C-terminale Deletionsmutanten kodieren. Als Kontrolle wurde leerer pCAGGS-Vektor transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und anschließend mit einem polyklonalen α -Flag Antikörper inkubiert. NP wurde daraufhin durch Inkubation mit einem FITC-gekoppelten α -Kaninchen Sekundärantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt.

Die intrazelluläre Verteilung der C-terminalen Deletionsmutanten entspricht der von wildtypischem NP (Abb. 37). Somit kann eine andersartige Verteilung der Mutanten als Ursache für die reduzierte NP-Z-Interaktion ausgeschlossen werden.

Da die C-terminalen Mutanten nicht mehr in der Lage sind, mit dem Z-Protein zu interagieren, wurde überprüft, ob sich diese fehlende Interaktion auch auf den Einbau der entsprechenden Mutanten in Z-induzierte VLPs auswirkt. Dazu wurden die Mutanten mit Z ko-exprimiert und anschließend die VLPs aus dem Überstand der Zellen isoliert und ihre Proteinzusammensetzung analysiert.

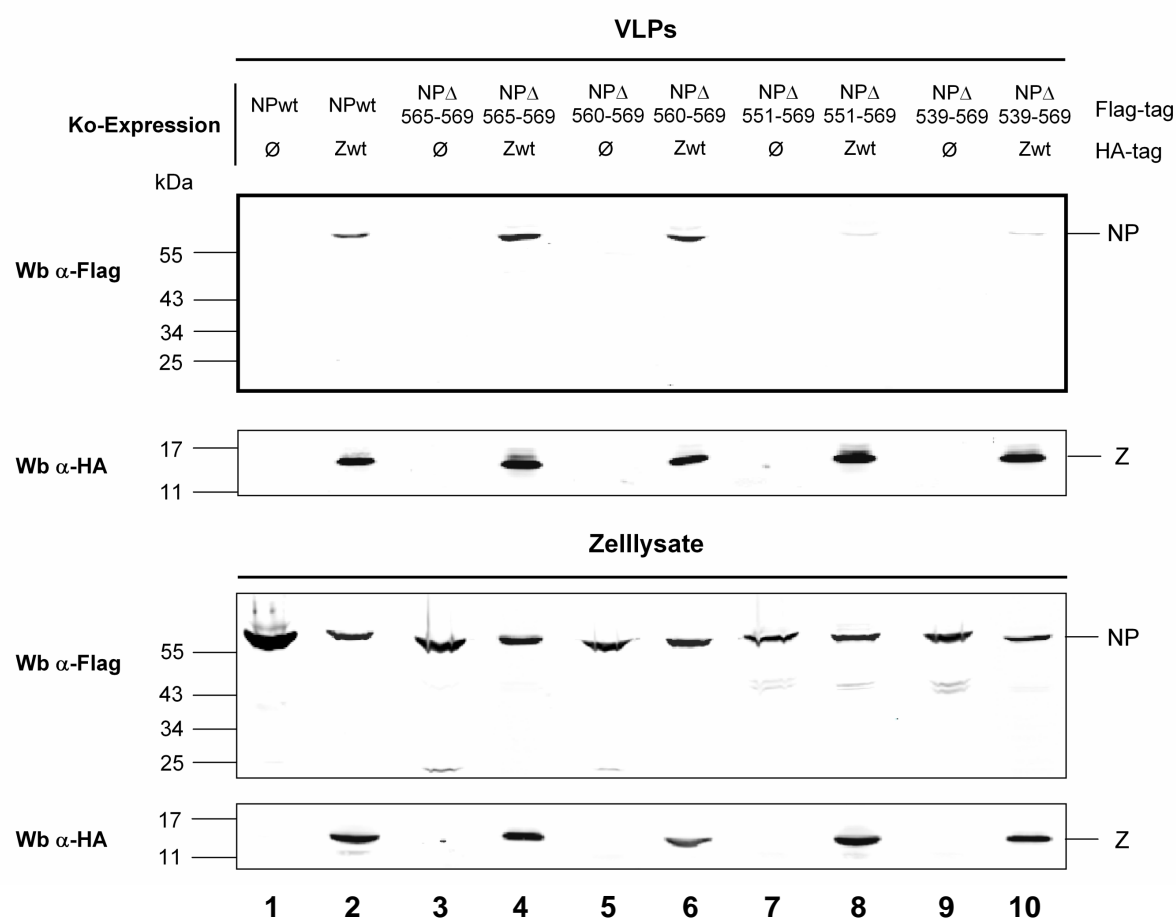


Abb. 38: Einbau von NP-Wildtyp und C-terminalen NP-Deletionsmutanten in Z-induzierte VLPs

HEK293T-Zellen wurden mit einem pCAGGS-Plasmid transfiziert, das für wildtypisches Z-HA kodiert. Zusammen mit diesem Konstrukt wurden pCAGGS-Plasmide ko-transfiziert, die für wildtypisches NP-Flag bzw. verschiedene C-terminale Deletionsmutanten kodieren (siehe Abb. 35). Als Kontrolle wurden die NP-Konstrukte alleine transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen, die enthaltenen VLPs isoliert und in 100 µl PBS_{def} resuspendiert. 20 µl dieser VLPs wurden in 4x Probenpuffer aufgenommen und zusammen mit einer Probe der Zelllysate als Expressionskontrolle per SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Die Detektion der Proteine erfolgte dabei über einen monoklonalen α-HA bzw. einen polyklonalen α-Flag – Antikörper. Wb = Western Blot.

Die Analyse der VLPs ergab, dass nur die Mutanten NP Δ 565-569 und NP Δ 561-569 (siehe Abb. 35) in mit dem wildtypischen NP vergleichbaren Mengen in den Überstand transfizierter Zellen freigesetzt werden (Abb. 38, Spuren 2, 4 und 6). Da diese Freisetzung in den Überstand nur bei Ko-Expression von Z stattfindet (Abb. 38, Spuren 3 und 5), kann angenommen werden, dass es sich dabei um spezifischen Einbau der Mutanten in Z-induzierte VLPs handelt. Bei Deletion von 19 oder mehr C-terminalen Aminosäuren lassen sich dahingegen nur noch sehr geringe Mengen der entsprechenden Mutanten in VLPs nachweisen (Abb.38, Spuren 8 und 10). Die Deletion führt also zu einer deutlichen Reduktion des Z-vermittelten Einbaus in VLPs und bestätigt somit die in den Ko-Immunpräzipitationen gemachten Beobachtungen.

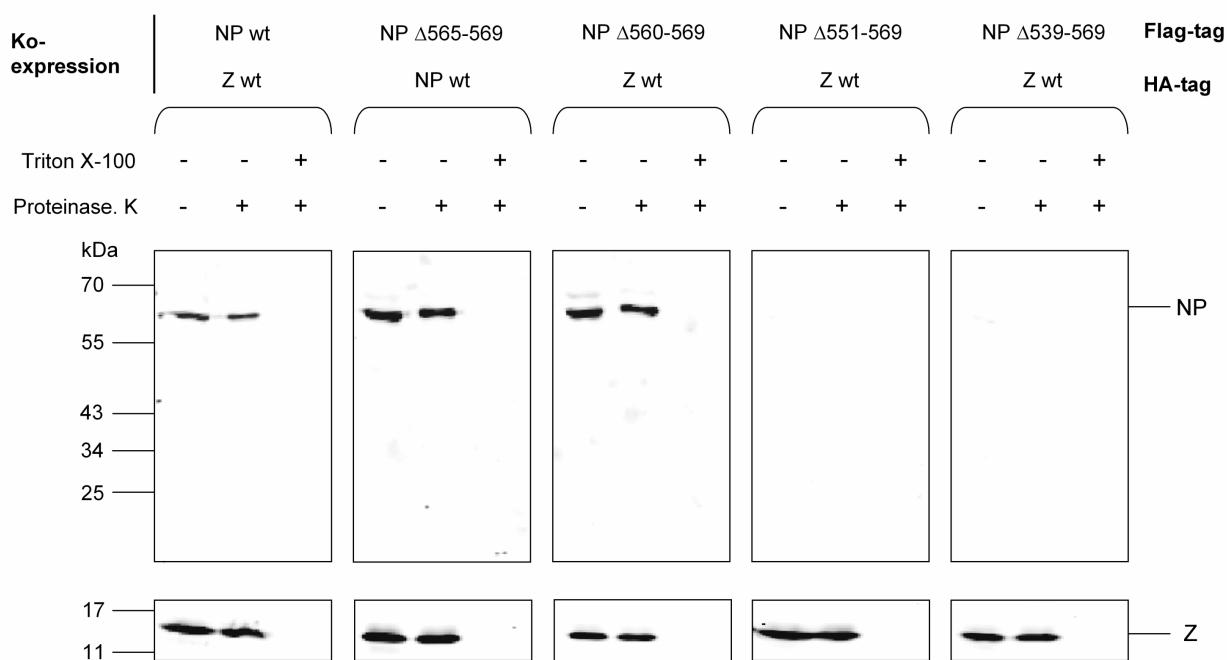


Abb. 39: Protease-Protektionsversuch mit NP-Z-VLPs

Die in Abb. 38 beschriebenen VLPs wurden in drei Fraktionen zu je 20 μ l aufgeteilt und mit Proteinase K in An- oder Abwesenheit von Triton X-100 behandelt. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 4x Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht. Die Proteine wurden dabei mit einem monoklonalen α -HA bzw. polyklonalen α -Flag Antikörper detektiert.

Der Protease-Protektionsversuch zeigte zudem, dass sich die Mutanten NP Δ 565-569 und NP Δ 561-569 (siehe Abb. 35) in lipidumhüllten Partikeln befinden (Abb. 39). Dies bestätigt, dass sich die Mutanten in Z-induzierten VLPs befinden. In Übereinstimmung mit der

vorherigen Beobachtung konnten die Mutanten NP Δ 551-569 und NP Δ 539-569 (siehe Abb. 35) nicht in VLPs nachgewiesen werden (Abb. 38).

Zusammengefasst zeigen diese Versuche, dass die C-terminale Domäne des NP von entscheidender Bedeutung für die Interaktion zwischen dem NP und dem Matrixprotein ist. Dahingegen wirkt sich die Deletion großer Bereiche des N-Terminus nicht negativ auf diese Interaktion aus. Die letzten 19 C-terminalen Aminosäuren sind für die NP-Z-Interaktion essentiell.

4.4.3 Interaktion zwischen prokaryotisch exprimiertem Nukleoprotein und Matrixprotein

Frühere Studien (Strecker et al, 2033; Shtanko et al, 2010, Levingston MacLeod et al, 2011, Ortiz-Riano et al, 2011) sowie die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zeigten, dass das Nukleoprotein und das Matrixprotein miteinander interagieren. Allerdings ist unklar, ob es sich bei dieser Interaktion um eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung handelt, oder ob die Assoziation beider Proteine über einen weiteren, gemeinsamen Bindungspartner vermittelt wird. Solche gemeinsamen Bindungspartner für NP und Z sind z.B. zelluläre Proteine (für nähere Details siehe Diskussion, Abschnitt 5.4). Bei diesen Proteinen handelt es sich ausschließlich um Proteine, die spezifisch in eukaryotischen Zellen exprimiert werden.

Da prokaryotisch exprimiertes NP und Z⁹ zur Verfügung standen, war es von Interesse zu überprüfen, ob diese beiden Proteine *in vitro* und somit in Abwesenheit der zellulären Bindungspartner miteinander interagieren. Um dieser Frage nachzugehen, wurden NP und Z in *E.coli* exprimiert, durch Affinitätschromatographie gereinigt und miteinander inkubiert. Die Interaktion beider Proteine wurde anschließend mittels Ko-Immunpräzipitation untersucht. Da der zur Verfügung stehende α -NP – Antikörper natives NP nur sehr schlecht präzipitiert (*Daten nicht gezeigt*), wurde zur Untersuchung der Interaktion MBP-NP eingesetzt. Um zu überprüfen, ob eine eventuelle Bindung an das Z-Protein durch den NP-Teil des Fusionsproteins vermittelt wird, wurde parallel derselbe Versuch mit MBP anstelle des MBP-NP durchgeführt.

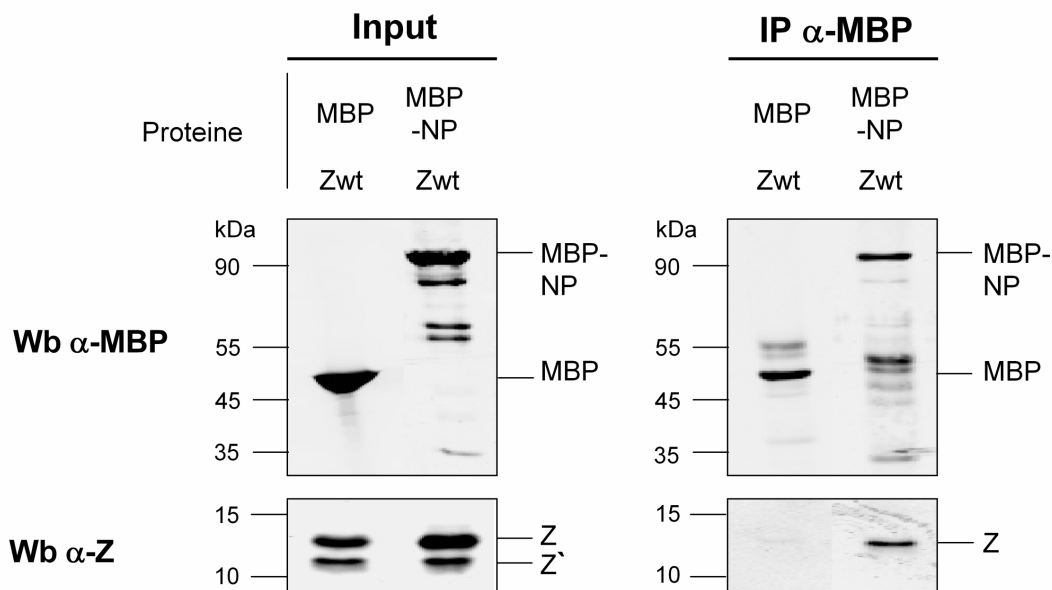


Abb. 40: Interaktion von bakteriell exprimiertem Nukleoprotein und Matrixprotein

Affinitätsgereinigtes MBP-NP und Z wurden zusammen in 500µl COIP-Puffer verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle wurde Z mit affinitätsgereinigtem MBP inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze einer Ko-Immunpräzipitation unter Verwendung eines polyklonalen MBP-Antikörpers unterzogen. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Detektion von Z erfolgte mit einem polyklonalen α-Z Antikörper, MBP-NP und MBP wurde mit einem monoklonalen α-MBP Antikörper nachgewiesen. Z' = degradiertes Z-Protein. Wb = Western Blot.

Durch die Ko-Immunpräzipitation konnte nachgewiesen werden, dass bakteriell exprimiertes MBP-NP mit Z-Protein, das aus Bakterien isoliert wurde, interagiert (Abb. 40). Eine mit dem spezifischen Z-Antikörper nachweisbare Proteinbande (Z'), die unterhalb des Z-Proteins detektiert wird und bei der es sich vermutlich um ein Degradationsprodukt des Z-Proteins handelt, wird hingegen nicht durch MBP-NP gefällt. Die Interaktion zwischen den Proteinen Z und NP ist dabei spezifisch, da das als Kontrolle verwendete MBP alleine nicht in der Lage ist, Z zu präzipitieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass NP und Z auch in Abwesenheit potentieller gemeinsamer Bindungspartner eukaryotischen Ursprungs direkt miteinander interagieren.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen dem Nukleoprotein NP und dem Matrixprotein Z durch die C-terminale Domäne des NP vermittelt wird. Dabei spielen insbesondere die letzten 19 C-terminalen Aminosäuren des NP eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es sich bei der NP-Z-Interaktion um eine direkte Interaktion beider Proteine handelt.

Im nächsten Schritt wurden nun die bisher gefundenen Ergebnisse auf die Interaktionen zwischen den Nukleoproteinen und Matrixproteinen verschiedener Arenaviren übertragen.

4.5 Konservierung der NP-NP und NP-Z-Interaktion innerhalb der *Arenaviridae*

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen beschränkten sich bislang auf die NP-NP sowie NP-Z – Interaktion für das Lassavirus. Über mögliche heterotypische Interaktionen zwischen den Proteinen verschiedener Arenaviren existieren allerdings nur sehr wenige Studien (Ortiz-Riano et al., 2011). Da Arenaviren ähnlich wie auch Influenza- oder Bunyaviren ein segmentiertes Genom besitzen, könnten derartige Interaktionen zur Rekombination und Bildung neuer Virusspezies beitragen. Welche Rolle dabei heterotypische Interaktionen insbesondere zwischen Proteinen des RNP-Komplexes und der Virushülle spielen, ist bislang ungeklärt.

Aus diesem Grund wurden potentielle heterotypische Interaktionen zwischen Nukleoproteinen und Matrixproteinen verschiedener Arenaviren untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Interaktion zwischen dem Lassavirus-NP und den Nukleoproteinen sowie Matrixproteinen verschiedenen Neuwelt-Arenaviren analysiert. Diese Untersuchungen sollten zusätzlich einen Hinweis auf die Konservierung des Mechanismus der NP-NP und NP-Z – Interaktion innerhalb der *Arenaviridae* liefern.

4.5.1 Heterotypische Interaktionen zwischen Nukleoproteinen verschiedener Arenaviren

Ein Vergleich verschiedener Arenavirus-Nukleoproteine zeigt, dass die Aminosäuresequenz des NP innerhalb der verschiedenen Arenavirus-Spezies unterschiedlich stark konserviert ist (siehe Anhang A3). Insbesondere zwischen den Nukleoproteinen der Altwelt- und Neuweltarenaviren existieren signifikante Unterschiede hinsichtlich der Primärstruktur. Die hydrophoben Aminosäuren nahe des N-Terminus, die in dieser Arbeit als kritisch für die NP-NP-Interaktion identifiziert wurden (siehe 4.2), sind allerdings innerhalb der Arenaviren hochkonserviert. Gleiches gilt für die an der NP-NP-Interaktion beteiligten Aminosäuren R52 und D500.

Daher stellte sich die Frage, ob der Mechanismus der NP-NP-Interaktion innerhalb der Arenaviren konserviert ist und ob das NP des Lassavirus mit Nukleoproteinen anderer Arenaviren interagieren kann. Als Bindungspartner für das NP wurden die Nukleoproteine der Neuweltarenaviren Junivirus (JUNV) und Tacaribevirus (TCRV) gewählt. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen diesen Nukleoproteinen beträgt 49 % (LASV NP – JUNV NP) bzw. 50% (LASV NP – TCRV NP). Um zu testen, ob eine Interaktion zwischen dem Lassavirus NP und dem NP des Tacaribevirus bzw. des Junivirus stattfindet,

4. Ergebnisse

wurden Ko-Immunpräzipitationsanalysen durchgeführt. Als Kontrolle wurde das Nukleoprotein des nicht mit den Arenaviren verwandten Influenzavirus A/Thailand/1(KAN-1)/04 (H5N1) verwendet (FluA, siehe 2.9).

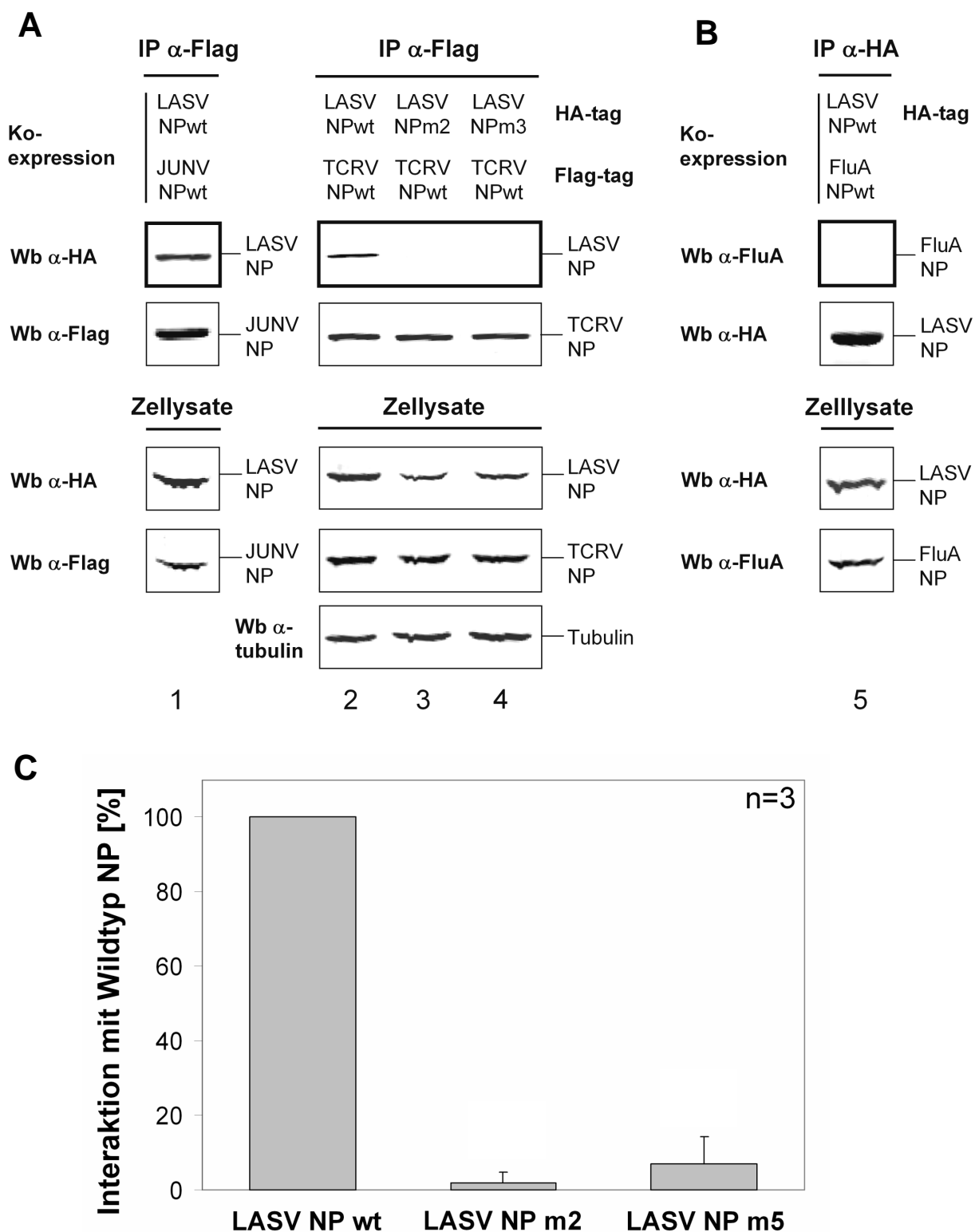


Abb. 41: Interaktion zwischen Nukleoproteinen der Neu- und Altweltarenaviren

(A) HEK293T-Zellen wurden mit pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für wildtypisches NP-Flag des Juninvirus (JUNV) oder wildtypisches NP-Flag des Tacaribevirus (TCRV) kodieren. Zusammen mit diesen Konstrukten wurden pCAGGS-Plasmide ko-transfiziert, die für wildtypisches NP-HA des Lassavirus (LASV, Spuren 1 und 2) oder die Mutanten NPm2-HA bzw. NPm3-HA (Spuren 3 und 4) kodieren (siehe Abb. 21). **(B)** Als Kontrolle wurde wildtypisches NP-HA des Lassavirus zusammen mit dem Nukleoprotein des Influenza A-Virus (FluA) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und einer Ko-Immunpräzipitation unter Verwendung eines polyklonalen α -Flag Antikörpers (A) bzw. eines monoklonalen α -HA Antikörpers (B) unterzogen. Ko-präzipitiertes NP wurde durch SDS-PAGE und Western Blot mit einem monoklonalen α -HA Antikörper (A) bzw. polyklonalen α -Influenza-NP Antikörpers (B) detektiert. Eine Probe der Zellysate wurde vor der Ko-Immunpräzipitation mittels SDS-PAGE und Western Blot aufgetrennt, um die Expression der einzelnen Proteine mit einem monoklonalen α -HA sowie polyklonalem α -Flag bzw. α -Influenza (siehe 2. 10.1) Antikörper zu überprüfen. Um die quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurde zudem Tubulin als Ladekontrolle durch einen monoklonalen α -Tubulin Antikörper detektiert. Wb = Western Blot. **(C)** Quantitative Auswertung dreier unabhängiger Experimente, wie unter (A) beschrieben. Für die Quantifizierung der Bandenintensität wurde die Odyssey-Software verwendet (siehe 3.4.7).

Beim Interaktionsvergleich zwischen den Nukleoproteinen verschiedener Arenaviren zeigte sich, dass sich sowohl das NP des Juninvirus, als auch das NP des Tacaribevirus in der Lage sind, mit dem NP des Lassavirus zu interagieren (Abb. 41A, Spuren 1 und 2). Im Gegensatz dazu konnte keinerlei Ko-Fällung von LASV NP und dem Nukleoprotein des Influenza A - Virus beobachtet werden (Abb. 41B), was auf die Spezifität der Interaktion zwischen den Arenavirus-Nukleoproteinen hindeutet. Da die Substitution der hydrophoben Aminosäuren innerhalb der Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ zur Reduktion der NP-NP-Interaktion für das Lassavirus führt (siehe Abb. 23), war es von Interesse zu überprüfen, ob ein ähnlicher Effekt auch für die heterotypischen Interaktionen auftritt. Daher wurde eine Ko-Immunpräzipitation zwischen wildtypischem Tacaribevirus NP und den Substitutionsmutanten NPm2 und NPm5 des Lassavirus Nukleoproteins durchgeführt. Die Substitution der Leucin- bzw. Valin-Reste führt wie auch bei der homotypischen LASV NP-NP-Interaktion (siehe Abb. 23) zu einem Verlust der heterotypischen Interaktion (Abb. 41A, Spuren 3 und 4, Abb. 41C).

Für das NP des Tacaribevirus ist beschrieben, dass es bei Einzelexpression in HuH7-Zellen diskrete, punktförmige Strukturen innerhalb des Zytoplasmas formt (*Svenja Wolff, unveröffentlichte Daten*). Im Gegensatz dazu weist das NP des Lassavirus eine diffuse, zytoplasmatische Verteilung auf (siehe Abb. 24). Da gezeigt werden konnte, dass die Nukleoproteine des Tacaribevirus und des Lassavirus eine heterotypische Interaktion eingehen (Abb. 41A), wurde untersucht, ob die Ko-Expression beider Proteine zu einer Umverteilung der Nukleoproteine in der Zelle führt. Zu diesem Zweck wurden das NP des

Lassavirus und des Tacaribevirus in HuH7-Zellen ko-exprimiert und ihre subzelluläre Verteilung mittels Immunfluoreszenzanalyse analysiert. Um eine unspezifische Umverteilung auszuschließen, wurde als Kontrolle das Nukleoprotein des nicht mit den Arenaviren verwandeten Ebolavirus (EBOV) verwendet, welches ebenfalls eine punktförmige Verteilung im Zytoplasma aufweist (Becker et al., 1998).

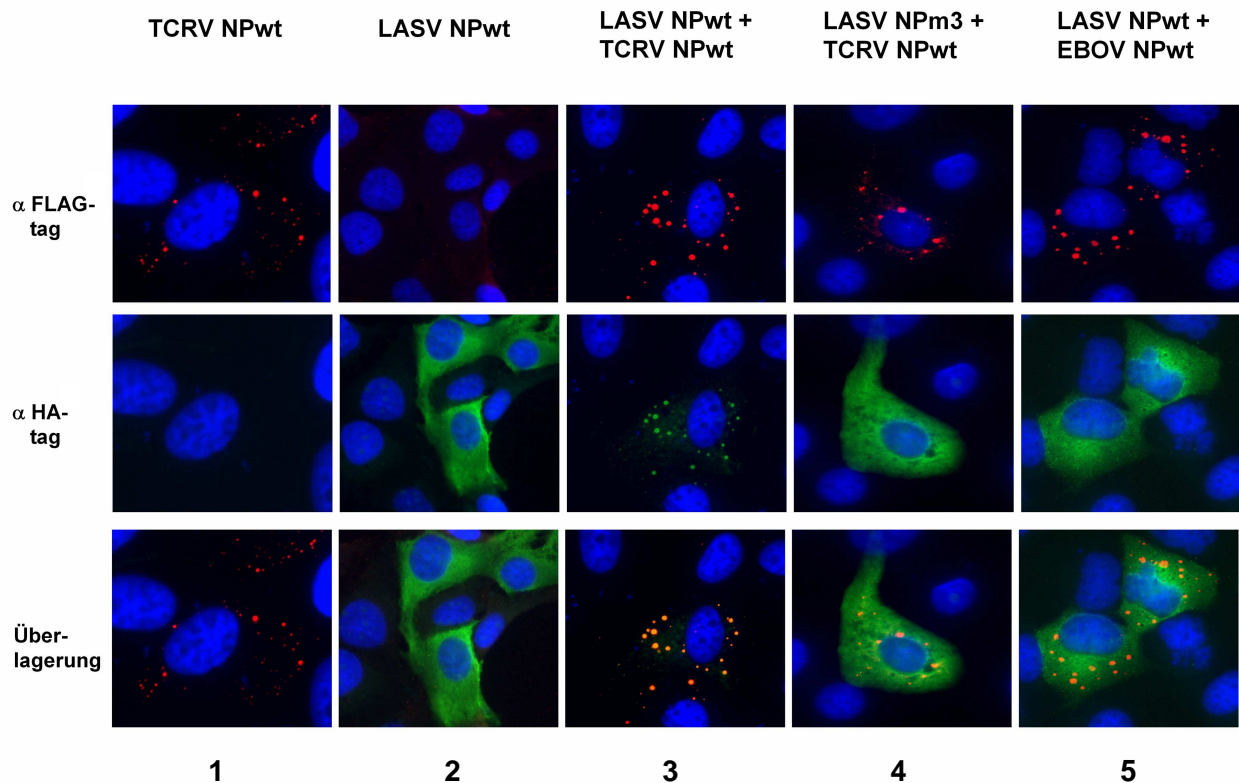


Abb. 42: Umverteilung des LASV NP in TCRV NP - induzierte Einschlusskörperchen

HuH7 Zellen wurden einzeln mit pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für wildtypisches NP-Flag des Tacaribevirus (TCRV) oder wildtypisches NP-HA des Lassavirus (LASV) kodieren. Weiterhin wurden Kombinationen aus pCAGGS-Plasmiden transfiziert, die für wildtypisches LASV NP-HA und TCRV NP-Flag, LASV NPm3-HA und wildtypisches TCRV NP-Flag oder wildtypisches LASV NP-HA und wildtypisches Ebolavirus (EBOV) NP-Flag kodieren. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Die Detektion der LASV Nukleoproteine erfolgte durch Inkubation mit einem monoklonalen α -HA Antikörper und einem FITC-gekoppelten α -Maus Sekundärantikörper. TCRV NP sowie EBOV NP wurden durch einen polyklonalen α -Flag Antikörper und einen Cy5-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt.

Bei Einzeltransfektion weisen die arenaviralen Nukleoproteine das für sie typische Verteilungsmuster auf (Abb. 42, Spalten 1 und 2), während bei Ko-Expression eine

Umverteilung des Lassavirus NP in die durch das NP des Tacaribevirus gebildeten, punktförmigen Einschlusskörperchen stattfindet (Abb. 42, Spalte 3). Im Gegensatz dazu findet sich eine solche Umverteilung des LASV NP nicht, wenn es zusammen mit dem NP des Ebolavirus exprimiert wird (Abb. 42, Spalte 5), was auf eine spezifische Interaktion zwischen LASV NP und TCRV NP hindeutet. Diese Annahme wird bestätigt durch die Beobachtung, dass für Mutante LASV NPm3, welche auch in der Ko-Immunpräzipitation nicht mehr in der Lage war, mit wildtypischen NP des Tacaribevirus zu interagieren (Abb. 41A), keinerlei Umverteilung stattfindet (Abb. 42, Spalte 4).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Nukleoproteine der Arenaviren in der Lage sind, heterotypische Interaktionen mit den Nukleoproteinen anderer Arenaviren einzugehen. Die Integrität der für das NP des Lassavirus ermittelten kritischen Aminosäuren ist auch für diese heterotypische Interaktion essentiell, was darauf hindeutet, dass der Mechanismus der NP-NP-Interaktion innerhalb der Arenaviren konserviert ist.

4.5.2 Heterotypische Interaktionen zwischen Nukleoproteinen und Matrixproteinen verschiedener Arenaviren

Nachdem bekannt war, dass die Nukleoproteine von phylogenetisch weit auseinander liegenden Arenaviren heterotypische NP-NP-Interaktionen eingehen können, stellte sich die Frage, ob sich diese Beobachtung auch auf die NP-Z-Interaktion ausweiten lässt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Interaktion zwischen dem NP des Lassavirus und verschiedenen Z-Proteinen anderer Arenaviren untersucht.

Dazu wurden das NP des Lassavirus zusammen mit dem Z-Protein der Lassavirus-Stämme Josiah und AV oder den Z-Proteinen der Neuweltarenaviren Tacaribevirus, Juninvirus oder Machupovirus ko-exprimiert. Anschließend wurden VLPs aus dem Überstand der Zellen isoliert und der Einbau des Lassavirus-NP in diese VLPs analysiert.

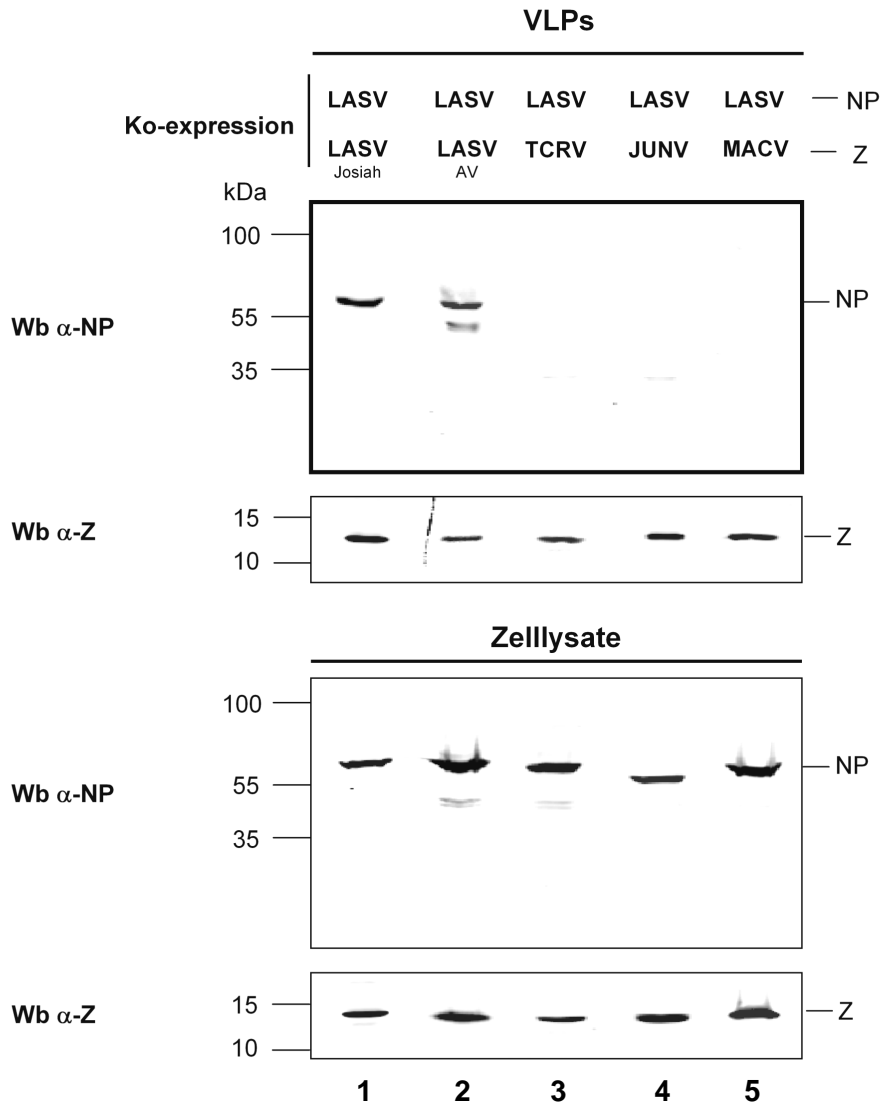


Abb. 43: Interaktion zwischen Lassavirus-NP und Matrixproteinen verschiedener Arenaviren

HEK293T-Zellen wurden mit einem pCAGGS-Plasmid transfiziert, das für wildtypisches Lassavirus (LASV) NP-HA kodiert. Zusammen mit diesem Konstrukt wurden pCAGGS-Plasmide ko-transfiziert, die für wildtypisches Z des Lassavirus Stammes Josiah oder AV bzw. wildtypisches Z-Flag des Tacaribevirus (TCRV), Juninvirus (JUNV) oder Machupovirus (MACV) kodieren. 48 h nach Transfektion wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen, die enthaltenen VLPs isoliert und in 100 µl PBS_{def} resuspendiert. 20 µl dieser VLPs wurden in 4x Probenpuffer aufgenommen und zusammen mit einer Probe der Zelllysate als Expressionskontrolle mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Die Proteine wurden über einen polyklonalen α-LASV-Z Antikörper, einen polyklonalen α-Flag Antikörper und einen monoklonalen α-HA Antikörper nachgewiesen. Wb = Western Blot.

Die Analyse der Proteinzusammensetzung der VLPs ergab, dass das NP des Lassavirus nur dann in Z-induzierte VLPs eingebaut wird, wenn das Z-Protein von einem der beiden verwendeten Lassavirus-Stämme stammt (Abb. 43, Spur 1 und 2). Die Z-Proteine der Neuweltarenaviren hingegen sind nicht in der Lage, das LASV-NP in VLPs einzulagern (Abb.

43, Spuren 3 bis 5). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass keine heterotypischen NP-Z - Interaktionen zwischen den entsprechenden Proteinen der Neu- und Altweltarenaviren stattfinden.

Nachdem gezeigt war, dass heterotypische NP-Z-Interaktionen zwischen den Proteinen phylogenetisch weit entfernter Arenaviren nicht möglich sind, wurde überprüft, ob dies für nahe verwandte Arenaviren ähnlich ist. Dazu wurden verschiedene Kombination aus Nukleoproteinen und Matrixproteinen der Neuweltarenaviren Juninvirus, Tacaribevirus und Machupovirus ko-exprimiert und der Einbau der NPs in Z-induzierte VLPs analysiert.

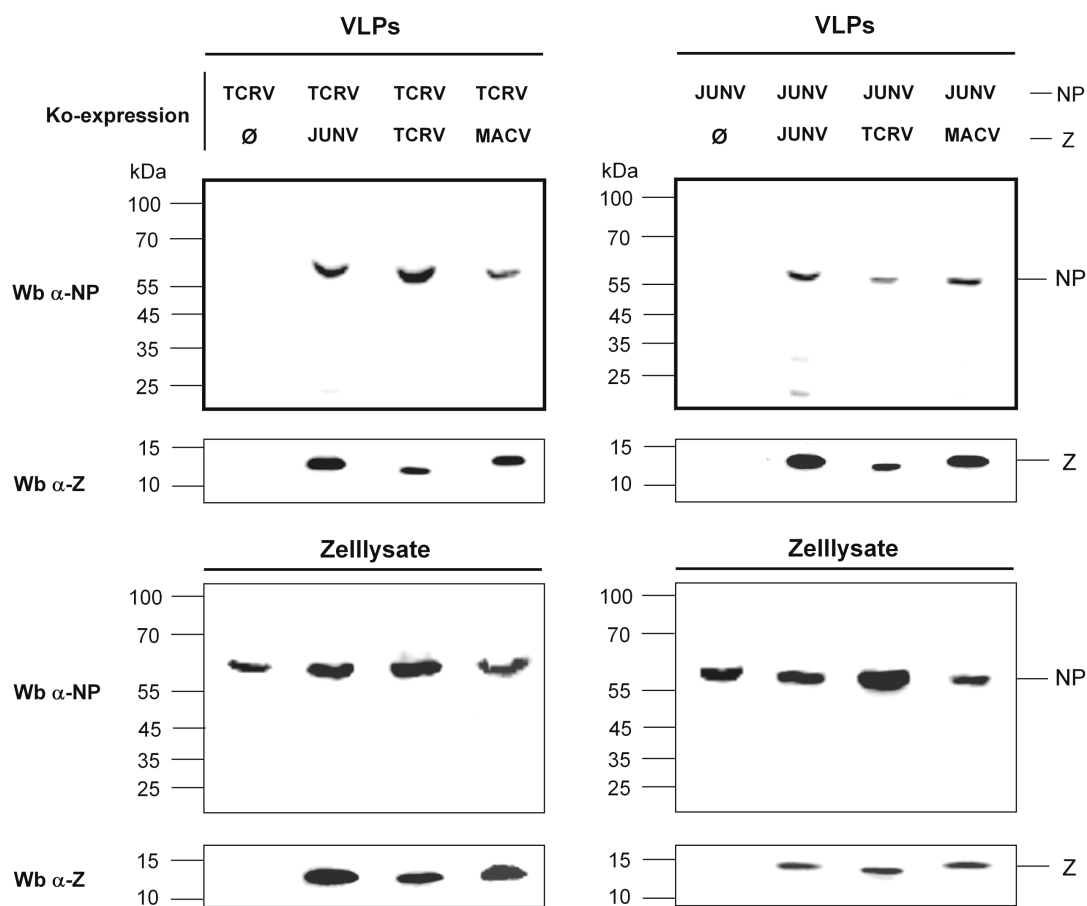


Abb. 44: Interaktion zwischen Nukleoproteinen und Matrixproteinen verschiedener Arenaviren

HEK293T-Zellen wurden mit einem pCAGGS-Plasmid transfiziert, das für wildtypisches NP-Flag des Juninvirus (JUNV) oder des Tacaribevirus (TCRV) kodiert. Zusammen mit diesem Konstrukt wurden pCAGGS-Plasmide ko-transfiziert, die für wildtypisches Z-HA des Juninvirus, Tacaribevirus oder Machupovirus (MACV) kodieren. Als Kontrolle wurden Konstrukte für die jeweiligen Nukleoproteine alleine transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen, die VLPs isoliert und in 100 µl PBS_{def} resuspendiert. 20 µl dieser VLPs wurden in 4x Probenpuffer aufgenommen und zusammen mit einer Probe der Zelllysate als Expressionskontrolle mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Die Proteine wurden über einen polyklonalen α-Flag-Antikörper und einen monoklonalen α-HA Antikörper nachgewiesen. Wb = Western Blot.

Bei der Analyse der VLP-Zusammensetzung zeigte sich, dass alle der hier verwendeten Matrixproteine unabhängig von ihrer Herkunft in der Lage sind, die Nukleoproteine verschiedener Neuweltarenaviren in VLPs einzubauen (Abb. 44). Dies verdeutlicht, dass heterotypische NP-Z – Interaktionen zwischen nahe verwandten Arenaviren möglich sind.

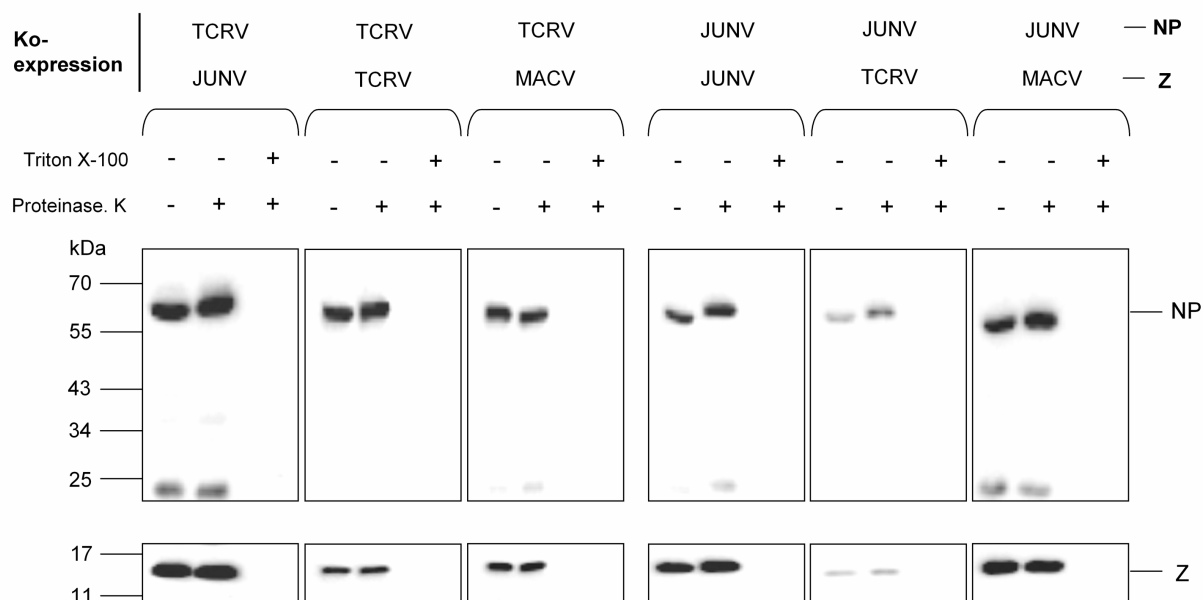


Abb. 45: Protease-Protektionsversuch mit NP-Z-VLPs

Die in Abb. 44 beschriebenen VLPs wurden in drei Fraktionen zu je 20µl aufgeteilt und mit Proteinase K in An- oder Abwesenheit von Triton X-100 behandelt. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 4x Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht. Die Proteine wurden dabei mit einem monoklonalen α-HA bzw. polyklonalen α-Flag Antikörper detektiert.

Der Protease-Protektionsversuch ergab, dass sich das bei Ko-Expression der verschiedenen Z-Proteine im Überstand freigesetzte TCRV- bzw JUNV-NP in lipidumhüllten Vesikeln befindet (Abb. 45). Dies bestätigt die Annahme, dass die Nukleoproteine des Juninvirus und Tacaribevirus durch spezifische Interaktion mit den jeweiligen Z-Proteinen in VLPs eingebaut werden.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen zusammenfassend, dass heterotypische Interaktionen zwischen den Nukleoproteinen verschiedener Arenavirus-Spezies möglich sind, was auf die Konservierung der daran beteiligten Proteindomänen hinweist. Im Gegensatz dazu sind heterotypische Interaktionen zwischen den Nukleoproteinen und Matrixproteinen verschiedener Arenaviren nur dann möglich, wenn es sich dabei um nahe verwandte Spezies handelt.

5. Diskussion

Das Nukleoprotein (NP) nimmt im Replikationszyklus der Arenaviren eine zentrale Stellung ein (siehe 1.4). Es existieren jedoch kaum Untersuchungen über die Oligomerisierung des NP und darüber, welche Rolle sie für die über die RNA-Bindung hinaus gehenden Funktionen des NP spielt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der NP-Oligomerisierung und ihrer Bedeutung für wichtige biologische Funktionen des NP. Dazu wurde der Zusammenhang zwischen der Multifunktionalität und den oligomeren Formen des NP dargestellt. Darüber hinaus wurden Bereiche innerhalb des NP identifiziert, die die Interaktion zwischen dem NP und dem Matrixprotein Z vermitteln. Basierend auf diesen Daten wurde ein detailliertes Bild für den Z-vermittelten Einbau der viralen RNP-Komplexe in neu entstehende Virionen erstellt. Folgende Aspekte wurden hierzu analysiert und werden im Folgenden diskutiert:

- 5.1 Charakterisierung der NP-Oligomerisierung
- 5.2 Identifikation von Bereichen des NP, die für die NP-NP-Interaktion wichtig sind
- 5.3 Bedeutung der NP-NP-Interaktion für dessen biologische Funktionen
- 5.4 Detaillierte Charakterisierung der NP-Z - Interaktion
- 5.5 Speziesübergreifende NP-NP und NP-Z – Interaktionen

5.1 Charakterisierung der Oligomerisierung von prokaryotisch und eukaryotisch exprimiertem Nukleoprotein

Zu Beginn dieser Arbeit war sowohl über die Bildung von Oligomeren als auch die strukturellen Eigenschaften des Nukleoproteins der Arenaviren nichts Näheres bekannt, obwohl die Struktur und die Oligomerisierung der Nukleoproteine zahlreicher Negativ-Strang RNA-Viren in den letzten Jahren sehr genau charakterisiert wurde. Ein Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Oligomerisierung des Arenavirus-Nukleoproteins am Beispiel des Lassavirus-NP zu untersuchen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass bakteriell exprimiertes Lassavirus-NP Trimere bildet (Abb. 14). Die Analyse dieser NP-Trimere mittels Negativ-Kontrastierung und Elektronenmikroskopie ergab, dass es sich bei den Trimeren des NP um ringförmige, rotationssymmetrische Strukturen handelt (Abb. 16). Diese Ringe ähneln hinsichtlich ihrer Form und Größe in guter Näherung dem Modell eines NP-Trimers (Abb. 46A), das auf Basis der Kristallstruktur des monomeren Lassavirus-NP erstellt wurde (Brunotte et al., 2011a; Qi et al., 2010).

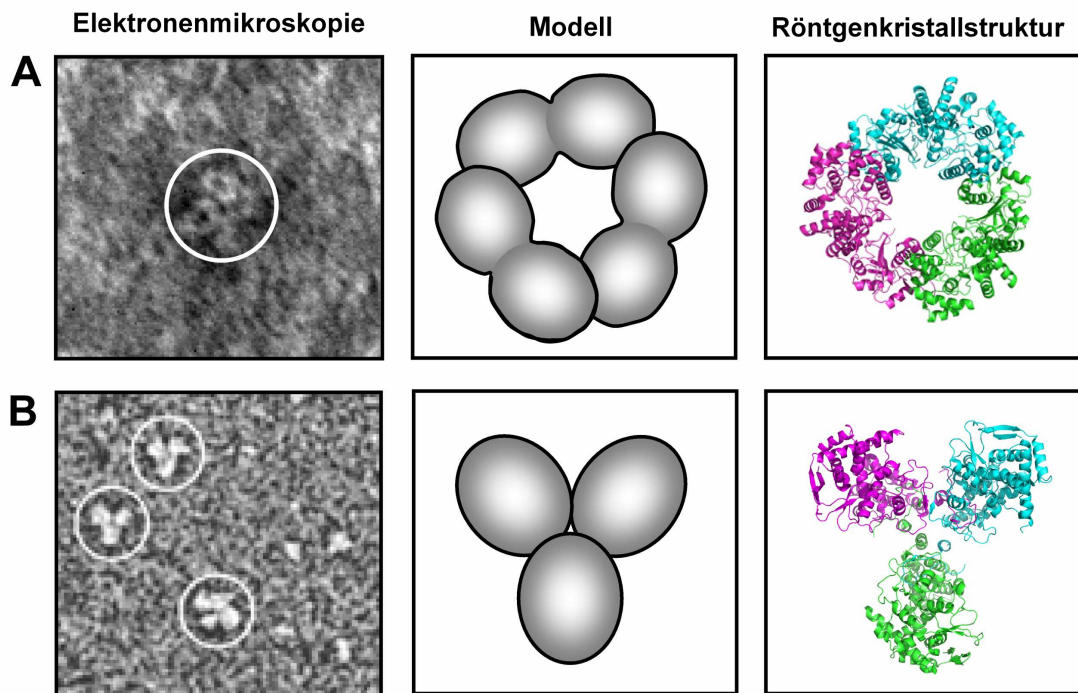


Abb. 46: Vergleich zwischen der Ultrastruktur der NP-Trimere und dem Modell des kristallographischen NP-Trimers für die Nukleoproteine des Lassavirus und des Influenza-A-Virus

(A) Auf Basis der elektronenmikroskopischen Aufnahmen (linkes Bild) wurde ein Modell eines einzelnen NP-Trimers erstellt (mittleres Bild). Daneben ist das anhand der Röntgen-Kristallstruktur des NP erstellte Modell eines NP-Trimers (Brunotte et al., 2011a) gezeigt (rechtes Bild). **(B)** Zum Vergleich sind elektronenmikroskopische Aufnahmen des Influenza-A-Nukleoproteins (linkes Bild, (Ye et al., 2006)), das Modell eines entsprechenden Nukleoprotein-Trimers (mittleres Bild) sowie das kristallographische Nukleoprotein-Trimer (PDB 2IQH; Ye et al., 2006) gezeigt (rechtes Bild).

Derartige ringförmige Nukleoprotein-Trimere sind innerhalb der Negativ-Strang RNA-Viren einmalig. Die Bildung von Trimeren konnte interessanterweise auch für die Nukleoproteine des Influenza-A-Virus und des Sin Nombre Virus beobachtet werden (Alfadhli et al., 2001; Ye et al., 2006). Letzteres gehört zu den Bunyaviren, wohingegen das Influenza-A-Virus zu den Orthomyxoviren gehört. Während für die Bunyaviren keine Daten zur Ultrastruktur der Nukleoprotein-Trimere existieren, zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass die Trimere des Influenza-A-Nukleoproteins im Gegensatz zu den hier untersuchten Trimeren des LASV-Nukleoproteins eine symmetrische, Y-förmige Struktur aufweisen (Abb. 46B), die durch Kontakte zwischen den C-terminalen Domänen einzelner Monomere um eine zentrale Achse herum entsteht (Ye et al., 2006). Darüber hinaus bildet das Nukleoprotein des Influenza-A-Virus bei Einzelexpression neben Trimeren auch andere oligomere Formen wie z.B. Tetramere. Für das aus Bakterien isolierte LASV-NP konnten in dieser Arbeit jedoch ausschließlich Trimere nachgewiesen werden (Abb. 14). Dies zeigt, dass die Trimerisierung eine intrinsische Eigenschaft des LASV-NP darstellt. NP-Trimere wurden darüber hinaus erst kürzlich auch für das NP des zu den Neuweltarenaviren

gehörenden Tacaribevirus beschrieben (Levingston Macleod et al., 2011). Die Zusammenlagerung des NP zu Trimeren ist also ein innerhalb der Arenaviren konserviertes Prinzip.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur prokaryotischen und eukaryotischen NP-Expression ergaben, dass in beiden Expressionssystemen ausschließlich NP-Trimere gebildet werden. Säugerzellenspezifische Faktoren, wie z.B. die für das NP des LCMV beschriebene Phosphorylierung (Howard and Buchmeier, 1983), oder die Interaktion mit Proteinen, die ausschließlich in Säugerzellen vorkommen, sind somit für die NP-Trimerisierung nicht essentiell.

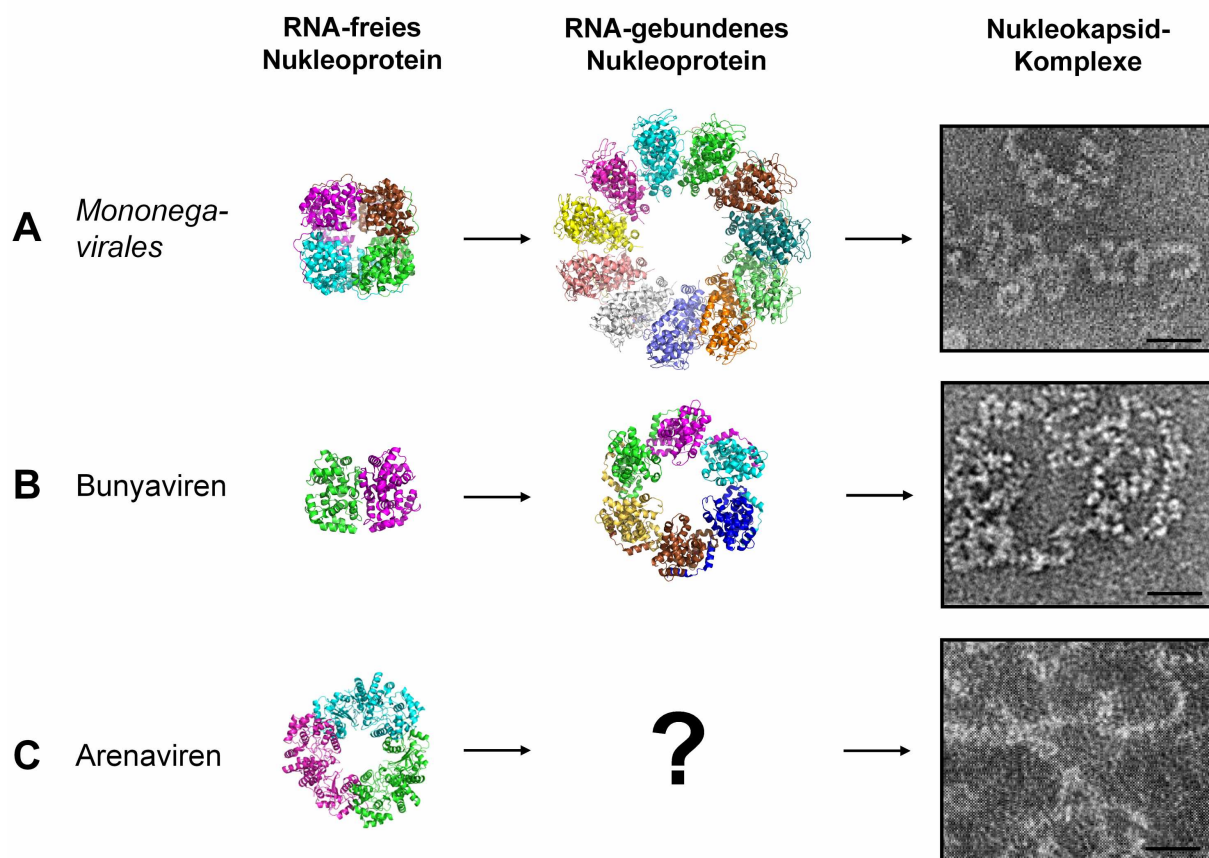


Abb. 47: Nukleoproteine und Nukleokapside verschiedener Negativ-Strang RNA-Viren

(A) Oligomere des Nukleoproteins der *Mononegavirales*. Von links nach rechts gezeigt sind die Struktur des tetrameren, RNA-freien Nukleoproteins des Bornavirus (PDB: 1N93; (Rudolph et al., 2003)), Ringe aus dem Nukleoprotein und der vRNA des Rabiesvirus (PDB: 2GTT, (Albertini et al., 2006)) sowie das Nukleokapsid des Rabiesvirus (Iseni et al., 1998). **(B)** Oligomere des Nukleoproteins der Bunyaviren. Von links nach rechts gezeigt sind die Struktur des dimeren, RNA-freien Nukleoproteins des Rift Valley fever virus (RVFV, PDB: 3LYF; (Raymond et al., 2010)), Nukleoprotein-Ringe, die der RNA-gebundenen Form entsprechen (PDB: 3OV9; (Ferron et al., 2011)) sowie das Nukleokapsid des RVFV (Raymond et al., 2010). **(C)** Oligomere des Nukleoproteins der Arenaviren. Links ist die Struktur des trimeren, RNA-freien Nukleoproteins des Lassavirus gezeigt (PDB: 3R3L; (Brunotte et al., 2011)), rechts das Nukleokapsid des Pichindevirus (Young and Howard, 1983). Die Übergangsform zwischen dem NP-Trimer und dem vRNA-Nukleokapsid-Komplex ist unbekannt. Balken in den Nukleokapsid-Bildern entspricht 25nm.

Da die NP-Trimerisierung innerhalb der Arenaviren konserviert ist, liegt die Vermutung nahe, dass sie eine spezifische biologische Bedeutung hat. Über die in dieser Arbeit untersuchten Funktionen (siehe 5.3) hinaus könnten die NP-Trimere als Grundbausteine bei der Bildung von Nukleokapsidkomplexen fungieren. Studien an den Nukleoproteinen verschiedener Negativ-Strang RNA-Viren ergaben, dass sich der oligomere Status des Nukleoproteins bei der Enkapsidierung der viralen RNA verändert. Möglicherweise ist dies auch bei der Bildung der Arenavirus-Nukleokapside der Fall. Diese Hypothese soll im Folgenden erläutert werden.

Ein Beispiel für die RNA-induzierte Veränderung der NP-Oligomerisierung findet sich beim Bornavirus, das zu den *Mononegavirales* gehört. Das Nukleoprotein dieses Virus wurde als Tetramer kristallisiert (siehe Abb. 47A oder Rudolph et al, 2003). Bei der Interaktion mit RNA werden diese Tetramere jedoch zu ringartigen Strukturen umgeformt, die aus 12 bis 13 Nukleoprotein-Monomeren bestehen (Hock et al., 2010). Die Bildung dieser Nukleoprotein-RNA-Ringe (Abb. 47A) ist innerhalb aller *Mononegavirales* konserviert (Ruigrok et al., 2011) und führt zur Ausbildung von helikalen Nukleokapsidkomplexen (Abb. 47A). Ein ähnliches Phänomen wurde auch für das Nukleoprotein des zu den Bunyaviren gehörenden Rift valley fever virus (RVFV) beschrieben. Während das Nukleoprotein dieses Virus in Abwesenheit viraler RNA Dimere bildet (siehe Abb. 47B oder Raymond et al, 2010), deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass sich diese Dimere bei der Interaktion mit dem viralen RNA-Genom umlagern, um ringförmige Nukleoprotein-RNA-Strukturen zu bilden (siehe Abb. 47B oder Ferron et al, 2011). Dieser Vorgang ist mit einer Konformationsänderung des Proteins verbunden, weist jedoch starke Gemeinsamkeiten zur Nukleokapsid-Bildung bei den *Mononegavirales* auf.

Wie der Übergang von den Nukleoprotein-Trimern zum vollständigen Nukleokapsid-Komplex bei den Arenaviren stattfindet, ist noch unbekannt (Abb. 47C). Es ist jedoch naheliegend, dass die Enkapsidierung der viralen RNA wie bei den Bunyaviren und den *Mononegavirales* eine Umformung der NP-Trimere voraussetzt. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen an rekombinantem, monomeren Lassavirus-NP zeigten, dass die Interaktion mit der viralen RNA durch den N-Terminus des NP vermittelt wird und ähnlich wie für das RVFV eine Konformationsänderung des Nukleoproteins voraussetzt (Hastie et al., 2011b). Diese Änderung in der NP-Struktur könnte zur Auflösung der NP-Trimere beitragen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an isolierten Arenavirus-RNPs (Young and Howard, 1983) deuten zudem darauf hin, dass das virale Genom durch einzelne Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 4-5 nm enkapsidiert wird, was in guter Näherung der Länge eines NP-Monomers entspricht (vgl. Abb. 16 und Abb. 47C). Absorptionsmessungen mit dem in dieser Arbeit beschriebenen, bakteriell exprimierten NP ergaben darüber hinaus, dass die isolierten NP-Trimere nicht wie die rekombinant exprimierten Nukleoproteine vieler anderer Viren mit RNA aus dem Expressionswirt assoziiert sind (*Daten nicht gezeigt*). Das NP-Trimer

ist also RNA-frei und somit vermutlich nicht die RNA-bindende Einheit bei der Bildung der Arenavirus-RNPs.

Insgesamt legen diese Beobachtungen nahe, dass das Arenavirus-Genom nicht direkt durch die in dieser Arbeit beschriebenen NP-Trimere, sondern durch die Aneinanderreihung einzelner NP-Monomere, ähnlich „Perlen an einer Schnur“, enkapsidiert wird. Die dazu nötige Disassemblierung der Trimere könnte durch die Interaktion mit der viralen RNA induziert werden, ähnlich wie es auch für das Bornavirus beschrieben wurde. Darüber hinaus könnte sie durch differentielle Phosphorylierung des Nukleoproteins oder durch die Interaktion mit anderen viralen Proteinen wie der Polymerase L hervorgerufen werden.

Um letztendlich experimentell zu überprüfen, wie das virale Genom durch das Nukleoprotein enkapsidiert wird, wären z.B. Interaktionsstudien zwischen viralen RNA-Fragmenten definierter Länge und rekombinantem NP oder die elektronenmikroskopische Untersuchung von vRNA-NP-Komplexen notwendig. Mit der Etablierung des bakteriellen Expressionssystems für das NP wurde in dieser Arbeit die Basis für derartige Untersuchungen geschaffen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Nukleoprotein der Arenaviren die intrinsische Eigenschaft hat, bei Einzelexpression stabile, ringförmige Trimere zu bilden. Posttranslationale Modifikationen in Säugerzellen sind hierfür nicht essentiell. Der Vergleich mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von RNPs verschiedener Arenaviren legt ein Modell nahe, bei dem sich die NP-Trimere während der Interaktion mit viraler RNA umlagern und so die viralen Nukleokapsid-Komplexe bilden.

5.2 Charakterisierung der NP-NP-Interaktion

Die Identifikation der Trimerisierung des Arenavirus-NP bedingte die nachfolgende Frage nach den Domänen, die eine solche Oligomerisierung vermitteln. Die erst gegen Ende dieser Arbeit veröffentlichte Strukturaufklärung des Lassavirus-Nukleoproteins sowie die Modellierung eines NP-Trimers auf Basis dieser Struktur ermöglichten eine Vorhersage über die an der NP-Trimerisierung beteiligten Proteinbereiche (Brunotte et al., 2011a). Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit gefundenen Daten daher mit Bezug auf die Kristallstruktur des Lassavirus-Nukleoproteins diskutiert werden.

Nachdem gezeigt wurde, dass das Lassavirus-NP in Säugerzellen Trimere bildet (siehe 4.1.2), wurden die für die NP-NP-Interaktion wichtigen Bereiche innerhalb des NP durch Ko-Immunpräzipitationsstudien mit Hilfe verschiedener Deletionsmutanten eingegrenzt. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Deletion großer Bereiche der C-terminalen Protein-domäne keine Auswirkung auf die Interaktion zwischen einzelnen NP-Molekülen hat (Abb. 20), wohingegen bereits die Deletion der ersten 86 N-terminalen Aminosäuren zu einem vollständigen Verlust der NP-NP-Interaktion führt (Abb. 19). Das deutet darauf hin, dass Proteinbereiche innerhalb der ersten 86 Aminosäuren des NP maßgeblich an der Vermittlung der NP-NP-Interaktion beteiligt sind. Diese These wird dadurch untermauert, dass die entsprechende Mutante nur noch als Monomer in Säugerzellen vorliegt (Abb. 25). Darüber hinaus lassen die Ko-Immunpräzipitationsstudien mit C-terminalen Deletionsmutanten darauf schließen, dass der C-terminale Teil des Proteins nicht maßgeblich an der NP-NP-Interaktion beteiligt ist. Ähnliche Beobachtungen über die Rolle der N- und C-terminalen Proteinbereiche bei der NP-NP-Interaktion wurden auch für das NP des Tacaribevirus gemacht (Levingston Macleod et al., 2011). Die Interaktion zwischen einzelnen NP-Monomeren scheint somit über N-terminale Proteinbereiche vermittelt zu werden. Solch ein Phänomen wurde interessanterweise auch für das Nukleoprotein des RVFV gefunden, das wie die Arenaviren zu den segmentierten Negativ-Strang RNA-Viren gehört (Ferron et al., 2011).

Da zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine Strukturinformationen über das Lassavirus-NP vorlagen, wurde eine Sekundärstrukturvorhersage¹⁰ durchgeführt. Diese zeigte, dass der N-terminale Bereich des Nukleoproteins eine große Anzahl an potentiellen α -Helices aufweist (siehe Anhang A2). Dabei fielen die Helices $\alpha 4$ (AS 61-77) sowie $\alpha 5$ (AS 96-117) auf. Diese enthalten zahlreiche langkettige, hydrophobe Aminosäuren, die in charakteristischer Weise in einem sog. Heptaden-repeat entlang der Helixachse angeordnet sind und zu einer Seite der Helix zeigen (Abb. 21). Solche Helices sind in der Lage, sog. *coiled coil* – Strukturen auszubilden, bei denen zwei Helices über ihre hydrophoben Aminosäuren miteinander in Kontakt treten. *Coiled coils* sind als Protein-Protein

10 : <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>, siehe Anhang A2

Interaktionsmotive bekannt (Burkhard et al., 2001) und spielen u.a. bei der Oligomerisierung viraler Proteine wie z.B. der Nukleoproteine des Ebolavirus oder des Hantavirus (Alminait et al., 2006; DiCarlo et al., 2007) eine wichtige Rolle. Die *in silico* - Analyse¹¹ ergab, dass die Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ potentiell in der Lage sind, *coiled coil* - Strukturen auszubilden (siehe Anhang A4). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ durch intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen direkt an der NP-NP-Interaktion beteiligt sind. Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene der in Frage kommenden Aminosäuren zu Alanin mutiert und mittels Ko-Immunpräzipitationsstudien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Mutation der langkettigen, hydrophoben Aminosäuren in den Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ zu einer signifikanten Reduktion der NP-NP Interaktion führt (Abb. 23). Dieses Ergebnis schien die These hinsichtlich der Beteiligung der Aminosäuren bei der NP-NP-Interaktion zu bestätigen.

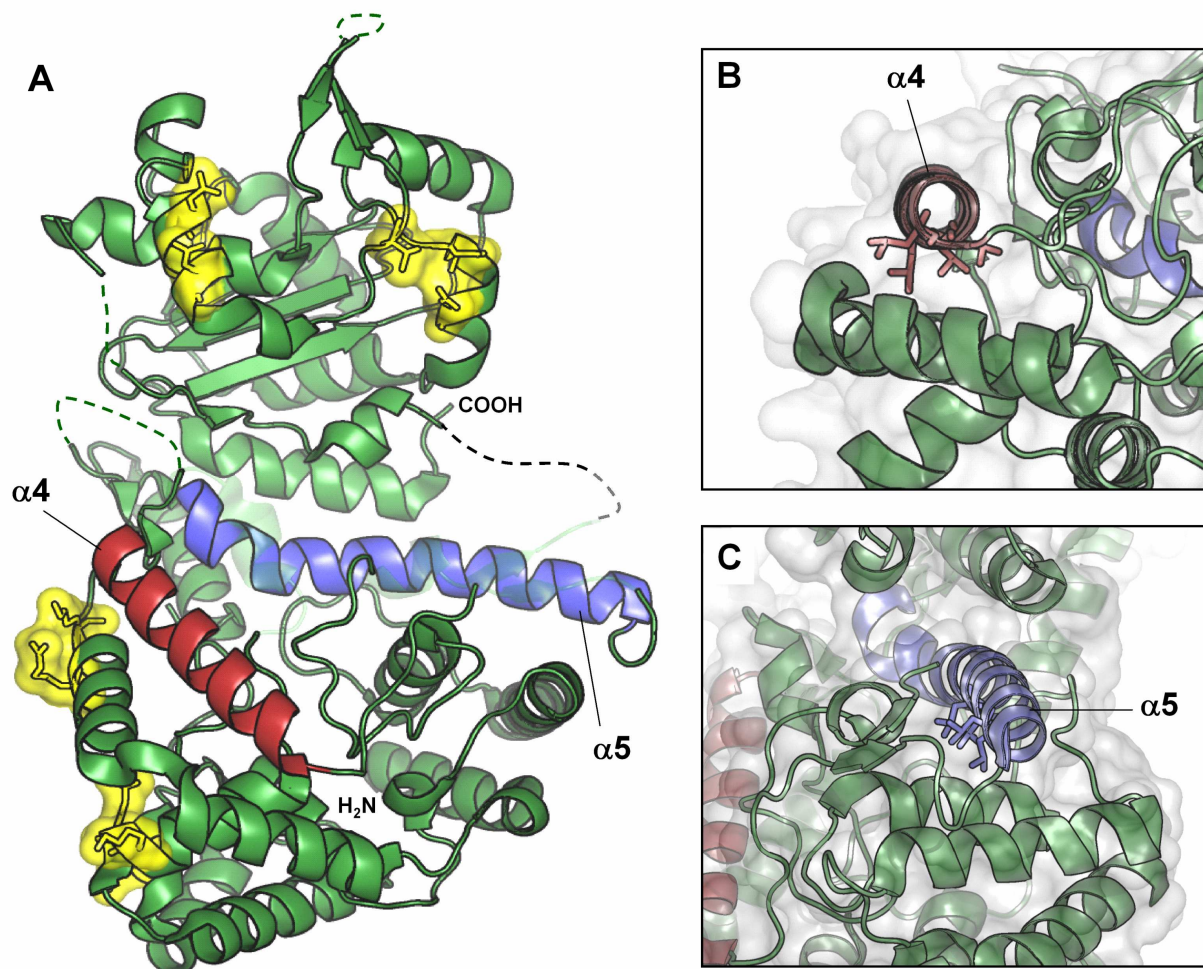


Abb. 48: Lage der Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ innerhalb der Struktur des monomeren NP

(A) Lage der Helices $\alpha 4$ (rot) und $\alpha 5$ (blau) innerhalb der Kristallstruktur des bakteriell exprimierten LASV-NP (PDB: 3MWP). Die Lage des N- bzw. C-Terminus ist angegeben. Aminosäuren, die im Modell eines NP-Trimers Kontakte zu anderen NP-Monomeren aufnehmen, sind als gelbe Stabprojektion gezeigt. (B) und (C) Position der in dieser Arbeit untersuchten langkettigen, hydrophoben Aminosäuren in Relation zu anderen, umgebenden Helices. Die Oberfläche des Moleküls ist als grau unterlegte, transparente Oberflächenprojektion gezeigt, die untersuchten Aminosäuren sind als Stabprojektion gezeigt.

11 : http://www.ch.embnnet.org/software/COILS_form.htm, siehe Anhang A4

Das auf der Kristallstruktur des Lassavirus-NP basierende Modell eines NP-Trimers zeigt, dass sich einzelne NP-Moleküle durch Kontakte zwischen den N- und C-terminalen Domänen verschiedener NP-Monomere zu einem Trimer zusammenlagern (Abb. 48A). Ein Teil der an der NP-NP-Interaktion beteiligten Aminosäuren liegt innerhalb der ersten 86 Aminosäuren. Bei Deletion dieser Aminosäuren kann es dementsprechend nicht mehr zur Zusammenlagerung einzelner Monomere zu einem Trimer kommen. Das Modell des NP-Trimers bestätigt somit die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung bezüglich der Bedeutung der ersten 86 Aminosäuren für die NP-NP-Interaktion. Die Ko-Immunpräzipitationsstudien zeigten allerdings auch, dass die C-terminale Proteindomäne keine Rolle für die NP-NP-Interaktion spielt. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass die Deletion verschiedener Bereiche der C-terminalen Proteindomäne solche Aminosäuren frei legt, die normalerweise im Inneren des Proteins liegen. Vermutlich führen diese Aminosäuren in der Ko-Präzipitation zu einer unspezifischen Interaktion.

Die Strukturaufklärung des Lassavirus-NP bestätigte zudem die Sekundärstrukturvorhersage und zeigte, dass die in dieser Arbeit mutierten hydrophoben Aminosäuren zu einer Seite der Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ hin ausgerichtet sind. Diese Aminosäuren zeigen jedoch zur Innenseite des Proteins (Abb. 48B und C) und sind nicht wie ursprünglich vermutet für inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen zwischen beiden Helices verfügbar. Die auf der *in silico* - Vorhersage basierende These, dass die Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ die NP-NP-Interaktion über Bildung eines *Coiled-coils* vermitteln, ist also nicht zutreffend. Es stellt sich daher die Frage, wie sich der in der Ko-Immunpräzipitation beobachtete Effekt erklären lässt.

Eine mögliche Erklärung dazu ist, dass die Mutation der hydrophoben Aminosäuren in beiden Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ zur Aggregation der entsprechenden Mutanten führt. Die Dichtegradientenzentrifugation zeigte aber, dass die zur Untersuchung der NP-NP-Interaktion verwendete Mutante NP m5 löslich ist und zu einem großen Teil als Monomer vorliegt (Abb. 25). Zudem weisen alle Alanin-Substitutionsmutanten eine mit dem Wildtyp-NP vergleichbare intrazelluläre Verteilung auf (Abb. 24) und werden in Z-induzierte VLPs eingebaut (Abb. 28). Dieser Befund spricht dafür, dass eine Fehlfaltung oder veränderte Lokalisation der Mutanten kein Grund für die reduzierte Interaktion mit dem Wildtyp-NP ist.

Möglicherweise tragen die hydrophoben Aminosäuren innerhalb der Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ auch durch Kontakte zu benachbarten Aminosäuren zur Stabilisierung einer für die NP-Oligomerisierung benötigten Konformation bei. Da die entsprechenden Mutanten löslich sind, bewirken die Mutationen in beiden Helices vermutlich nur eine lokale Konformationsänderung bzw. die Erhöhung der Flexibilität einzelner Sekundärstrukturen. Ein solcher indirekter Effekt auf die an der NP-NP-Interaktion beteiligten Sekundärstrukturen lässt sich anhand der räumlichen Lage der Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ erläutern.

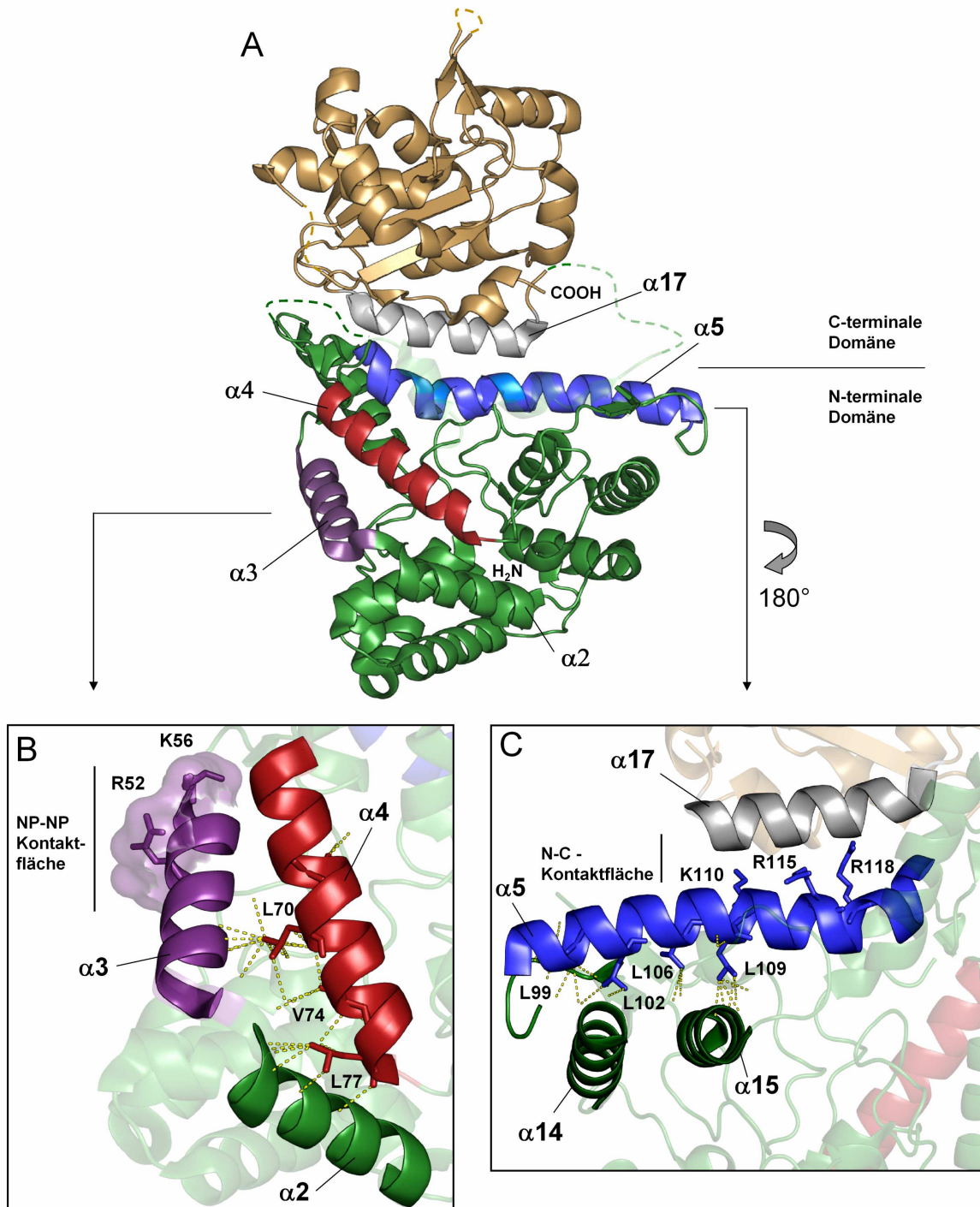


Abb. 49: Lage der Helices $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 17$ innerhalb der Struktur des monomeren NP

(A) Position der Helices $\alpha 3$ (lila), $\alpha 4$ (rot), $\alpha 5$ (blau) und $\alpha 17$ (grau) innerhalb der Kristallstruktur des LASV-NP (PDB: 3MWP). **(B)** Position der Helix $\alpha 4$ in Relation zur Helix $\alpha 3$ und $\alpha 2$. Die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren innerhalb der Helix $\alpha 4$ sowie die an der NP-NP-Interaktion beteiligten Aminosäuren sind als Stabprojektion gezeigt. Die mittels des Programmes PyMol berechneten Kontakte sind als gestrichelte Linien in gelb dargestellt. **(C)** Kontakte zwischen hydrophoben Aminosäuren der Helix $\alpha 5$ und umgebenden Helices $\alpha 14$, $\alpha 15$ und $\alpha 17$. Die mittels des Programms PyMol berechneten Kontakte sind als gestrichelte Linien in gelb dargestellt. Die Aminosäuren an der Grenzfläche zwischen der N- und der C-terminalen Domäne (N-C-Kontaktfläche) sowie hydrophobe Aminosäuren in der Helix $\alpha 5$ sind in Stabprojektion gezeigt.

Die Kristallstruktur des LASV-NP zeigt, dass die Aminosäuren L67, L70, V74 und L77 der Helix $\alpha 4$ Bestandteil einer hydrophoben Tasche sind, die zur Stabilisierung der umliegenden Helices $\alpha 2$ und $\alpha 3$ beiträgt (Abb. 49B). Die Helix $\alpha 3$ umfasst die Aminosäuren R52 und K56. Beide Aminosäuren sind im Modell des NP-Trimers an der Interaktion zwischen einzelnen Monomeren beteiligt und bilden einen Teil der N-terminalen NP-NP-Kontaktfläche (Brunotte et al., 2011a). Die Bedeutung der Aminosäure R52 für die NP-NP-Interaktion wird darüber hinaus durch die in dieser Arbeit durchgeführte Mutationsanalyse bestätigt (Abb. 23). Durch die Mutation der hydrophoben Aminosäuren der Helix $\alpha 4$ wird die Stabilisierung der Kontaktfläche aufgehoben, was dazu führt, dass die Aminosäuren R52 und K56 nicht mehr in der richtigen Position sind, um mit der C-terminalen Interaktionsfläche eines weiteren NP-Monomers zu interagieren. Die hier durchgeführten Mutationsanalysen zeigen also, dass die NP-NP-Interaktion von der exakten Positionierung der Aminosäuren R52 und K56 abhängt.

Im Gegensatz zur Helix $\alpha 4$ liegt die Helix $\alpha 5$ nicht in der Nähe der anhand des modellierten NP-Trimers vorhergesagten Kontaktstelle zwischen zwei NP-Monomeren (Abb. 48A). Daher basiert der für die Mutanten m4 und m5 beobachtete Effekt wahrscheinlich nicht auf einer indirekten Wechselwirkung mit den für die NP-Oligomerisierung wichtigen Bereichen. Allerdings liegt die Helix $\alpha 5$ unmittelbar an der Helix $\alpha 17$ und somit an der Kontaktstelle zwischen der N- und der C-terminalen Proteindomäne des NP (Abb. 49C). Erst kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigten, dass Kontakte zwischen der N- und der C-terminalen Domäne wichtig für die Stabilisierung eines NP-Trimers sind (Hastie et al., 2011b). Diese Kontakte werden durch die geladenen Aminosäuren K110, R115 und R118 (Abb. 49C) der Helix $\alpha 5$ vermittelt. Die Leucin-Reste der Helix $\alpha 5$ hingegen zeigen zum Inneren der N-terminalen Domäne und nehmen dort Kontakte zu den Helices $\alpha 14$ und $\alpha 15$ auf, die die Helix $\alpha 5$ an ihrer Position fixieren (Abb. 49C). Durch Mutation der hydrophoben Aminosäuren L99 und L102 könnte die Position der Helix $\alpha 5$ und somit die Kontaktstelle zwischen der N- und der C-terminalen Domäne verändert werden. Diese Destabilisierung könnte zu der hier beobachteten Abschwächung der NP-NP-Interaktion führen.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die Integrität der N-terminalen Domäne von entscheidender Bedeutung für die Trimerisierung des LASV-NP ist. Bereits geringe Änderungen an konservierten Aminosäuren führen zu einem vollständigen Verlust der NP-NP-Interaktion. Darüber hinaus zeigen die vorgestellten Daten, dass das anhand der Struktur des bakteriell exprimierten LASV-NP erstellte Modell eines NP-Trimers sowie die daraus hergeleiteten Kontakte zwischen einzelnen Monomeren auch für das in Säugerzellen exprimierte NP zutreffen und somit die Beobachtungen, die für bakteriell exprimiertes LASV-NP gemacht wurden auf die Situation in Säugerzellen übertragen werden können.

5.3 Bedeutung der NP-Oligomerisierung für die biologische Funktion des Nukleoproteins

Die Hauptfunktion viraler Nukleoproteine ist die Enkapsidierung und somit der Schutz des viralen Genoms. Dies spielt insbesondere für RNA-Viren eine große Rolle, da ungeschützte virale RNA sehr schnell abgebaut werden kann (Barr and Fearn, 2010) und zusätzlich in der Lage ist, die intrazelluläre Interferon-Antwort zu induzieren (Baum and Garcia-Sastre, 2010). Darüber hinaus haben die Nukleoproteine verschiedener Viren auch weitere, zentrale Funktionen wie z.B. eine regulatorische Rolle bei der Replikation des viralen Genoms (Kawaguchi et al., 2011), die Induktion einer Immunsuppression im infizierten Wirt (Marie et al., 2004) oder als RNA-Chaperon (Mir and Panganiban, 2006). Während diese Funktionen oftmals gut charakterisiert sind, ist die Rolle der Oligomerisierung der Nukleoproteine für diese Prozesse in vielen Fällen unbekannt.

Auch das Nukleoprotein der Arenaviren ist neben der Enkapsidierung des viralen Genoms an der Regulation von Transkription und Replikation (Pinschewer et al., 2003) und dem Einbau der RNP-Komplexe in neue Virionen (Eichler et al., 2004) beteiligt. Zudem ist es für die Inhibition der Typ I Interferon-Antwort verantwortlich (Martinez-Sobrido et al., 2007). Über den Zusammenhang zwischen der NP-Oligomerisierung und diesen Funktionen ist jedoch nichts Näheres bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das NP des Lassavirus stabile Trimere bildet (4.1). Darüber hinaus wurden Mutanten generiert, die eine stark reduzierte Interaktion mit wildtypischem NP (Abb. 19 und 23) und ein verändertes Oligomerisierungsmuster aufweisen (Abb. 25). Diese Mutanten wurden daher in verschiedenen Testsystemen verwendet, um die Rolle der NP-Oligomerisierung für die folgenden biologischen Funktionen zu analysieren:

- (i) die Replikation des Lassavirus-Minigenoms (5.3.1)
- (ii) den Einbau des NP in Z-induzierte VLPs und (5.3.2)
- (iii) die Inhibition der Interferon-I Antwort (5.3.3)

5.3.1 Bedeutung der NP-Trimerisierung für die Replikation und Transkription des viralen Genoms

Das Nukleoprotein der Arenaviren ist ein essentieller Ko-Faktor für die Replikation und Transkription des viralen Genoms. Zusammen mit der Polymerase L ist das NP in der Lage, das virale Genom zu replizieren und die viralen Gene zu transkribieren (siehe 1.4.1). Die in

dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen belegen, dass die NP-Trimerisierung essentiell für die Funktionalität des Nukleoproteins bei diesen Prozessen ist. NP-Mutanten, die eine verminderte NP-NP-Interaktion aufweisen oder nur noch als Monomer in der Zelle vorliegen, zeigen eine deutliche Reduktion bei der Replikation des Lassavirus-Minigenoms (Abb. 27). Ein ähnliches Phänomen wurde bisher nur für das Marburgvirus (DiCarlo et al., 2007) und das Influenza-A-Virus (Coloma et al., 2009) beschrieben. In beiden Fällen ist die Oligomerisierung des Nukleoproteins eine wichtige Voraussetzung für die Transkription und Replikation des viralen Genoms. Es stellt sich die Frage, wie sich dieser Effekt für das Lassavirus-NP erklären lässt.

Untersuchungen am NP des Tacaribevirus und des LCMV zeigten, dass die Enkapsidierung des viralen Genoms essentiell für dessen Replikation und Transkription ist (Lopez et al., 2001; Pinschewer et al., 2003). Diese Verpackung des Genoms setzt allerdings eine Interaktion zwischen einzelnen NP-Monomeren voraus. Da die hier verwendeten Mutanten eine deutlich reduzierte NP-NP-Interaktion aufweisen, ist die Enkapsidierung der viralen RNA durch diese Mutanten vermutlich stark eingeschränkt. Dies hat zur Folge, dass die Replikation des Genoms zum Erliegen kommt. Zusätzlich wäre die Bildung von Transkripten stark vermindert, da lediglich das durch Transfektion eingebrachte Minigenom als Vorlage für die Transkription des Reportergens dienen kann.

Mit dem verwendeten Testsystem kann nicht zwischen Replikation und Transkription des Minigenoms unterschieden werden. Es wäre daher möglich, dass die Reduktion der Reportergen-Expression auf einer fehlenden Transkription des Minigenoms basiert. Untersuchungen am LCMV zeigten allerdings, dass das NP sowohl Replikation als auch Transkription gleichermaßen beeinflusst (Pinschewer et al., 2003). Da eine hohe Transkription zugleich auch die Replikation des Minigenoms voraussetzt, ist die wahrscheinlichste Erklärung, dass der beobachtete Effekt allein auf der fehlenden Replikation und der dadurch verminderten Bildung von Transkripten des Reportergens beruht. Um zu überprüfen, ob die reduzierte Reportergenexpression auf einem Defekt bei der Replikation und/oder Transkription beruht, wären Northern Blot – Analysen notwendig, um die fehlende Produktion der Genome und Antigenome bzw. Transkripte nachzuweisen.

Untersuchungen an den NP und L – Proteinen der Arenaviren zeigten, dass beide Proteine miteinander interagieren können (Jacamo et al., 2003; Kerber et al., 2011). Ob diese Interaktion für die Replikation oder Transkription des viralen Genoms von Bedeutung ist, ist allerdings ungeklärt. Möglicherweise beruht die Reduktion der Genomreplikation und/oder Transkription daher auf einer fehlenden Interaktion der entsprechenden NP-Mutanten mit der viralen Polymerase L. Um diese Vermutung zu überprüfen, wären Ko-Immun-

präzipitationsstudien zwischen dem L-Protein und den verschiedenen NP-Mutanten notwendig. Derartige Versuche wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, da kein Expressionsplasmid für die virale Polymerase zu Verfügung stand.

Nachdem geklärt war, dass die NP-Trimerisierung für die Replikation des viralen Genoms von entscheidender Bedeutung ist, wurde analysiert, welche Rolle sie für die beiden anderen eingangs beschriebenen Funktionen des NP spielt.

5.3.2 Bedeutung der NP-Trimerisierung für die Interaktion mit dem Matrixprotein Z

Über die Rolle der NP-Trimerisierung für die Interaktion mit dem Z-Protein lagen zu Beginn dieser Arbeit keine Daten vor. Daher wurde der Einbau verschiedener NP-Mutanten in Z-induzierte VLPs analysiert. Die Untersuchungen zeigten, dass die NP-Trimerisierung keine Voraussetzung für die Interaktion des Nukleoproteins mit dem Matrixprotein ist (Abb. 28). Dies bedeutet, dass der exakte oligomere Status keine Rolle für die Bindung des NP an das Z-Protein spielt. Das NP liegt innerhalb der RNP-Komplexe nicht als Trimer, sondern als mit der viralen RNA komplexiertes Polymer vor. Dadurch, dass die Interaktion mit Z unabhängig von der Art der gebildeten NP-Oligomere ist, wird gewährleistet, dass die RNP-Komplexe, die vermutlich aus langen, kontinuierlichen RNA-NP-Ketten bestehen (siehe 5.1), in neue Virionen verpackt werden können.

5.3.3 Bedeutung der NP-Trimerisierung für die Funktionalität des NP als Antagonist der Typ I Interferon-Antwort

Über die Bedeutung der Oligomerisierung für die Funktion viraler Interferon-Antagonisten existieren bisher nur sehr wenige Studien. Untersuchungen am VP35 des Ebolavirus, das ein starker Interferon-Antagonist ist, ergaben, dass nur ein VP35-Trimer als Interferon-Antagonist fungieren kann (Reid et al., 2005). Auch das Lassavirus-NP bildet Trimere, jedoch zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Analysen, dass die NP-Trimerisierung keine Voraussetzung für die Funktion des NP als Interferon-Antagonist ist (Abb. 30). Wie lässt sich diese Beobachtung im Vergleich mit dem VP35 des Ebolavirus erklären? Möglicherweise liegt der Grund für die unterschiedliche Bedeutung der Oligomerisierung im Mechanismus, mit dem beide Proteine ihre Funktion ausüben. Das VP35 bindet doppelsträngige RNA. Durch diese Interaktion steht es in direkter Konkurrenz zu dem zellulären Faktor RIG-I und verhindert so die RIG-I induzierte Hochregulierung der Interferon β -Antwort (Cardenas et al., 2006). Das NP des Lassavirus interagiert ebenfalls mit doppelsträngiger RNA, es baut diese aber über eine C-terminal gelegene 3'-5' Exonuklease

ab. Während ein trimerer VP35-Komplex den Vorteil der Multivalenz und somit effizienteren Bindung der doppelsträngigen RNA bietet (Leung et al., 2010), scheint dies für das NP des Lassavirus nicht nötig zu sein. Hier scheint die Effizienz vielmehr von der Aktivität der Exonuklease abzuhängen. Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass bereits monomeres NP eine ausreichend hohe Aktivität aufweist, um die Typ I Interferon-Antwort effizient zu hemmen (Vergleich Aktivität NPwt mit NP Δ 1-86 in Abb. 30).

Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass sowohl die Interaktion mit dem Z-Protein als auch die Funktion als Typ I Interferon – Antagonist von monomeren NP ausgeübt werden könnten (Abb. 28 und 30). Da das NP jedoch die intrinsische Eigenschaft besitzt, Trimere zu bilden, kann davon ausgegangen werden, dass dies auch während einer Virusinfektion der Fall ist und monomeres NP höchstens in sehr geringen Konzentrationen vorliegen würde. Es stellt sich also die Frage, ob die Beobachtung, dass auch monomeres NP mit dem Z-Protein interagiert und als Interferon-Antagonist fungieren kann, eine biologische Relevanz hat.

Interessanterweise konnten für das NP des Lassavirus in verschiedenen Zelltypen zwei sehr spezifische, stabile Fragmente nachgewiesen werden (NP Δ , Abb. 17). Diese Fragmente entstehen vermutlich durch Spaltung innerhalb der N-terminalen Domäne des NP (Abb. 17). Solche Spaltfragmente finden sich auch für die Nukleoproteine der Altwelt-Arenaviren LCMV (siehe Martinez-Sobrido et al, 2009, dort Abb. 2B) und Mopeiavirus (siehe Shtanko et al, 2010, dort Abb. 4A), sowie bei den Neuweltarenaviren Tacaribevirus und Juninvirus (Svenja Wolff, AG. Prof. Dr. Becker, *persönliche Mitteilung*). Für das Juninvirus und das Tacaribevirus konnte zudem gezeigt werden, dass die Menge der Spaltfragmente bei Behandlung transfizierter Zellen mit einem Protease-Inhibitor reduziert wird (Svenja Wolff, AG. Prof. Dr. Becker, *persönliche Mitteilung*). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Fragmente durch eine spezifische Spaltung durch eine zelluläre Protease entstehen.

Die Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugation zeigten, dass die Spaltfragmente als Monomere vorliegen (Abb. 18). Da die zur Entstehung der Fragmente führende Spaltung des NP höchstwahrscheinlich an dessen N-Terminus stattfindet und die für die Funktionen der 3'-5' Exonuklease sowie der Interaktion mit dem Z-Protein verantwortlichen Domänen im C-Terminus des NP lokalisiert sind (siehe 4.4 sowie Martinez-Sobrido et al, 2009), scheint es plausibel, dass sich diese Spaltfragmente wie die Deletionsmutante NP Δ 1-86 verhalten und nach wie vor in der Lage sind, mit dem Z-Protein zu interagieren und als Antagonisten der Typ I Interferon-Antwort zu fungieren. Basierend auf diesen Beobachtungen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass ein Teil des NP während einer Virusinfektion durch zelluläre Proteasen gespalten wird. Während das trimere NP einen intrazellulären „pool“ darstellt, der für die Replikation, Transkription und Enkapsidierung des viralen Genoms zur Verfügung

steht, könnten die Spaltfragmente mit dem Z-Protein interagieren, sowie die Funktion als Interferon – Antagonist übernehmen und die zelluläre Immunantwort unterdrücken. Die Existenz der entsprechenden Spaltfragmente konnte bis jetzt in Lassavirus-infizierten Zellen allerdings noch nicht nachgewiesen werden, da neben dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, der gegen die N-terminale Domäne des NP gerichtet ist, kein geeigneter Antikörper zur Verfügung steht. Beobachtungen am Juninvirus zeigten jedoch, dass beide Spaltfragmente auch in virusinfizierten Zellen nachgewiesen werden können (*Svenja Wolff, AG. Prof. Dr. Becker, persönliche Mitteilung*). Um die Hypothese bezüglich der Funktion der Spaltfragmente zu überprüfen, wären der Nachweis der Spaltfragmente während der Lassavirus-Infektion sowie weiterführende Experimente notwendig, die z.B. die Inhibition der Spaltung und ihre Auswirkung auf die Aktivierung der Typ I Interferon-Antwort beinhalten.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass die Oligomerisierung des NP eine zentrale Rolle für die Replikation und/oder Transkription des viralen Genoms spielt, während sie für die Funktion des NP als Interferon-Antagonist und die Interaktion des NP mit dem Matrixprotein Z nicht von Bedeutung ist. Die Existenz spezifischer NP-Spaltfragmente deutet darauf hin, dass diese Funktionen von zwei verschiedenen NP-Populationen in der infizierten Zelle ausgeübt werden könnten.

5.4 Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und dem Matrixprotein Z

Mit Ausnahme der Bunyaviren verfügen alle Negativ-Strang RNA-Viren über ein Matrixprotein, das die innere Virushülle auskleidet. Das Genom dieser Viren liegt zusammen mit dem Nukleoprotein und der viralen Polymerase in RNP-Komplexen vor. Durch eine Interaktion zwischen dem Matrixprotein und dem Nukleoprotein werden die RNPs in neu entstehende Virionen eingebaut. Die Bindung dieser beiden Proteine aneinander dient somit als „Brücke“ zwischen der Virushülle und dem Genom und ist für die Freisetzung von neuen, infektiösen Viren essentiell. Auch der Einbau des Arenavirus-Genoms wird über eine Interaktion des Nukleoproteins mit dem Matrixprotein Z vermittelt (Eichler et al., 2004; Schlie et al., 2010a). Wie genau diese Interaktion jedoch stattfindet, war bisher unbekannt.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Bereiche innerhalb des NPs an der Interaktion mit dem Z-Protein beteiligt sind. Die dazu durchgeführten Experimente ergaben, dass bereits die Deletion der letzten 104 C-terminalen Aminosäuren zu einer starken Reduktion der NP-Z-Interaktion führt (Abb. 32B und Abb. 33). Im Gegensatz dazu sind die ersten 312 N-terminalen Aminosäuren, die genau der N-terminalen Proteindomäne entsprechen (vgl. Abb. 49), nicht direkt an der Interaktion mit dem Matrixprotein beteiligt oder tragen nur einen sehr kleinen Teil zur Interaktion zwischen beiden Proteinen bei (Abb. 32A und Abb. 33). Diese Beobachtungen zeigen, dass die C-terminale Proteindomäne essentiell für die Interaktion zwischen Matrixprotein und dem NP ist, während die N-terminale Domäne dabei keine maßgebliche Rolle spielt. Eine derartige Zuordnung scheint innerhalb der Arenaviren konserviert zu sein, da ähnliche Beobachtungen erst kürzlich für das Tacaribevirus (Levingston Macleod et al., 2011) und das Mopeiavirus (Shtanko et al., 2010) gemacht wurden.

Die Kristallstruktur des Lassavirus-NP zeigte, dass die C-terminale Domäne einen konservierten Zink-Finger enthält, der ein zentral gelegenes Zink-Atom koordiniert (Abb. 35). Bei Deletion der letzten 104 Aminosäuren werden auch Teile dieses Motivs entfernt. Mutationen des homologen Zink-Fingers im NP des Tacaribevirus führten darüber hinaus zu einer stark reduzierten Interaktion zwischen NP und Z (Levingston Macleod et al., 2011). Diese Beobachtungen zeigen, dass der Zink-Finger für die NP-Z-Interaktion essentiell ist. Da auch das Matrixprotein in der Lage ist, Zink-Atome zu binden (Salvato and Shimomaye, 1989), könnte die Interaktion zwischen dem NP und dem Matrixprotein auf der gemeinsamen Koordination eines oder mehrerer Zink-Atome basieren. Das durch den Zink-Finger des NP gebundene Zink-Atom ist jedoch unzugänglich im Inneren des Moleküls verborgen (Qi et al, 2010) und steht somit nicht für eine derartige gemeinsame Zink-Bindung zur Verfügung. Es

ist daher wahrscheinlicher, dass der Zink-Finger ein essentielles Motiv für die korrekte Faltung der C-terminalen Domäne des NP ist. Die für das Tacaribevirus (Levingston Macleod et al., 2011) und das Lassavirus (Abb. 32 und 33) beobachtete Reduktion der NP-Z-Interaktion bei Deletion bzw. Mutation der Zink-kordinierenden Aminosäuren ließ daher die Frage offen, ob der beobachtete Effekt auf einer veränderten räumlichen Struktur des NP oder auf der Deletion eines möglichen Bindemotivs für die Interaktion mit dem Matrixprotein basiert. Letztere Vermutung wurde durch die weitere Eingrenzung der für die NP-Z-Interaktion wichtigen Bereiche innerhalb des NP bestätigt. Bereits die Deletion der letzten 19 C-terminalen Aminosäuren führte zu einer stark verminderten Interaktion zwischen der entsprechenden Mutante und dem Z-Protein (Abb. 36 und 38). Möglicherweise befinden sich in diesem Bereich Aminosäuren, die direkte Kontakte zum Z-Protein aufnehmen, was die starke Reduzierung der NP-Z-Interaktion bei Deletion dieser Bereiche erklären könnte.

Zusammengenommen zeigen diese Beobachtungen, dass die Interaktion zwischen dem NP und dem Matrixprotein durch die C-terminale Proteindomäne vermittelt wird und dass die Aminosäuren 550-569 essentiell für die Bindung des Matrixproteins an das NP sind. Möglicherweise befindet sich innerhalb dieses Bereiches ein Bindemotiv für das Z-Protein. Alternativ könnten Aminosäuren aus diesem Bereich auch Teil eines größeren Motivs sein, an dem weitere Aminosäuren aus der C-terminalen Domäne beteiligt sind. Ein Beispiel für ein solches Interaktions-„Interface“ findet sich beim VP40 des Ebolavirus (Nguyen et al., 2005). Weiterführende Untersuchungen wie z.B. die Ko-Kristallisation des Nukleoprotein-Matrixprotein-Komplexes könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Sowohl das Matrixprotein als auch das NP verschiedener Arenaviren interagieren mit zellulären Partnern (siehe 1.3.2 und 1.4.1). Dabei spielen besonders Proteine der ESCRT-Maschinerie eine große Rolle, da sie maßgeblich an der Bildung und Abschnürung neuer Virionen beteiligt sind. Ein solches Protein ist ALIX/A1P. Untersuchungen am Mopeiavirus, das mit dem Lassavirus verwandt ist, zeigten, dass sowohl das NP als auch das Matrixprotein dieses Virus in der Lage sind, mit ALIX/A1P zu interagieren (Shtanko et al., 2011). Da NP und Z somit in ALIX/A1P einen gemeinsamen Bindepartner haben, stellte sich die Frage, ob es sich bei der beobachteten NP-Z-Interaktion um eine direkte Interaktion handelt, oder ob die Bindung des Z-Proteins an das NP über einen gemeinsamen Interaktionspartner vermittelt wird.

Die dazu durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass bakteriell exprimiertes NP mit ebenfalls aus Bakterien isoliertem Matrixprotein interagieren kann (Abb. 40). Im Genom der für die Expression verwendeten Bakterien lassen sich allerdings keine Homologe des Proteins ALIX/A1P finden¹². Da NP und Z trotzdem miteinander interagieren, muss es sich bei der NP-Z-Interaktion um eine direkte Bindung beider Partner handeln, die von

12 : Ergebnis eines Sequenz-Vergleichs zwischen ALIX/A1P (Ref-Seq : NP_037506) und dem translatierten Genom von *E.coli*. Vergleich durchgeführt unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi

Säugerzell-spezifischen Faktoren wie ALIX/A1P unabhängig ist. Dies schließt nicht aus, dass ein gemeinsam gebundener Interaktionspartner beim Transport von NP und Z in der Zelle oder an der Rekrutierung des zellulären ESCRT-Komplexes beteiligt ist. Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten allerdings zusätzlich darauf hin, dass auch eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen NP und dem Matrixprotein stattfindet und vermutlich für den spezifischen Einbau der RNP-Komplexe in Virionen verantwortlich ist.

Zusammengefasst zeigen die hier vorgestellten Daten, dass ein sehr kleiner Bereich innerhalb der C-terminalen Domäne des NP essentiell für die Interaktion mit dem Z-Protein ist. Zudem legen die Untersuchungen an bakteriell exprimierten Nukleoprotein und Matrixprotein nahe, dass diese Interaktion direkt ist und nicht über ein weiteres zelluläres oder virales Protein vermittelt wird. In verschiedenen Studien wurden die Bereiche innerhalb des Z-Proteins, die für die NP-Z-Interaktion essentiell sind, auf die zentral gelegene RING-Domäne (Abb. 5) eingegrenzt (Casabona et al., 2009).

Auf Basis dieser Beobachtungen und den hier vorgestellten Daten wurde daher ein vorläufiges Modell für die NP-Z-Interaktion an der Virusmembran aufgestellt (Abb. 50).

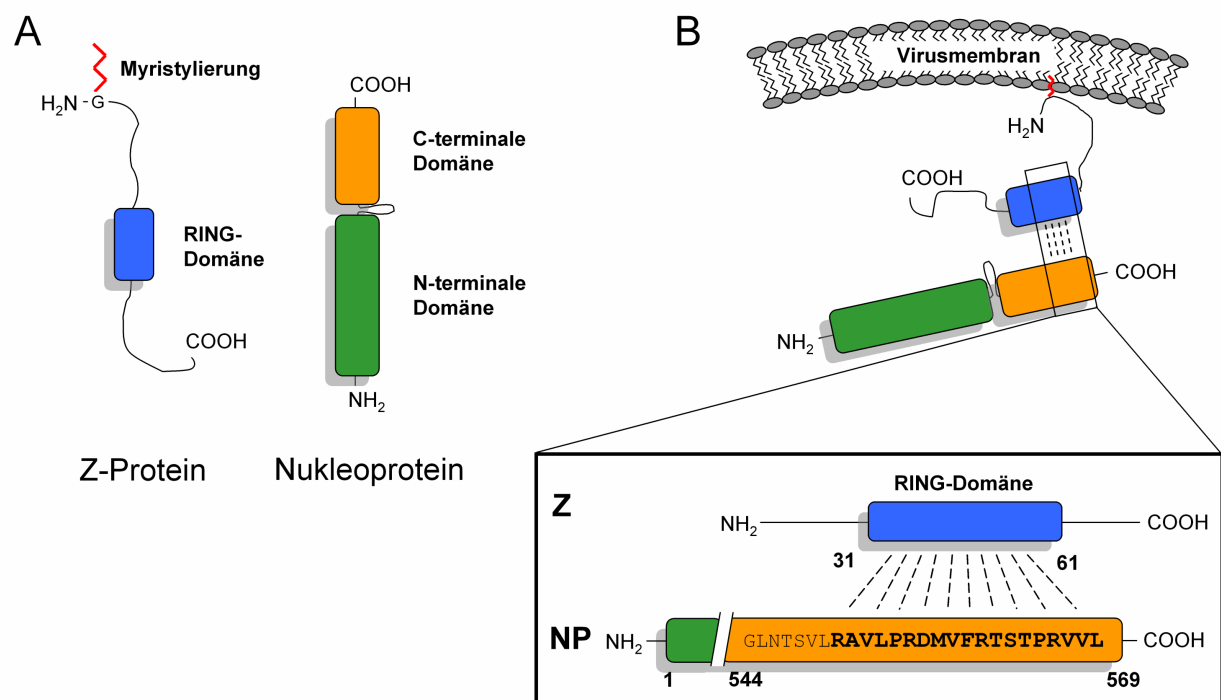


Abb. 50: Modell für die NP-Z-Interaktion an der Virusmembran

(A) Schematische Darstellung des Z-Proteins und des Nukleoproteins. Die zentrale RING-Domäne des Z-Proteins (blauer Kasten), die die Interaktion mit NP vermittelt (Casabona et al., 2009), sowie die Myristylsäure, über die das Z membranverankert ist (siehe 1.3.2), sind dargestellt. **(B)** Modell für die Interaktion zwischen dem Z-Protein und dem Nukleoprotein. Die Interaktion findet zwischen der RING-Domäne des Z-Proteins und der C-terminalen Domäne des NP statt und ist durch gestrichelte Linien angedeutet. Die in dieser Arbeit ermittelten, kritischen Aminosäuren im NP sind fett unterlegt.

5.5 Konservierung der NP-NP und NP-Z-Interaktion innerhalb der *Arenaviridae*

Die Arenaviren sind eine sehr diverse Virusfamilie, die neben den 34 klassifizierten Spezies auch zahlreiche neu entdeckte, noch nicht klassifizierte Viren enthält (Coulibaly-N'Golo et al., 2011). Die einzelnen Virusspezies unterscheiden sich innerhalb der Arenaviren nicht nur in ihrer geographischen Verbreitung, sondern weisen auch signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer Biologie auf (siehe 1.1). Es stellt sich daher die Frage, ob sich diese Unterschiede auch auf Ebene der Protein-Protein-Interaktion zwischen den einzelnen Virusbestandteilen widerspiegeln.

Um die Konservierung der gefundenen Mechanismen innerhalb der Arenaviren zu analysieren, wurden daher die Versuche zur NP-NP und NP-Z - Interaktion auf die entsprechenden Proteine verschiedener Arenavirus-Spezies ausgeweitet. Neben der möglichen Konservierung der Mechanismen sollten diese Versuche zusätzlich einen Hinweis auf die Fähigkeit zur Reassortanten-Bildung zwischen verschiedenen Arenaviren liefern.

Zur Untersuchung der heterotypischen NP-NP-Interaktion wurde die Interaktion zwischen dem NP des Lassavirus und den Nukleoproteinen der Neuweltarenaviren Juninvirus und Tacaribevirus untersucht. Diese Versuche zeigten, dass das NP des Lassavirus sowohl mit dem NP des Juninvirus als auch mit dem NP des Tacaribevirus interagieren kann, nicht aber mit dem NP des nicht-verwandten Influenza-A-Virus (Abb. 41). Zudem ist das NP des Tacaribevirus in der Lage, das NP des Lassavirus innerhalb der Zelle umzuverteilen, was ebenfalls für eine direkte Interaktion zwischen diesen beiden Nukleoproteinen spricht (Abb. 42). Dies verdeutlicht, dass es sich bei der Interaktion zwischen den NPs verschiedener Arenaviren um eine spezifische Interaktion handelt, die vermutlich durch eine direkte Wechselwirkung und nicht z.B. durch gemeinsame Bindung beider NPs an zelluläre Proteine oder RNAs hervorgerufen wird.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zeigen somit, dass auch NPs von phylogenetisch weit entfernten Arenaviren miteinander interagieren. Dies bedeutet, dass sowohl der Mechanismus der NP-NP-Interaktion sowie die daran beteiligten Proteinbereiche, als auch die NP-Trimerisierung selbst innerhalb der Arenaviren konserviert sind. Unterstützt wird diese These dadurch, dass Mutationen, die die Wechselwirkung zwischen einzelnen NP-Molekülen des Lassavirus unterbinden, auch die heterotypischen Interaktionen in vergleichbarer Weise herabsetzen (Abb. 41). Zudem zeigen Untersuchungen am Tacaribevirus, dass auch das NP dieses Virus Trimere bilden kann (Levingston Macleod et al., 2011).

Die Beobachtung, dass die NP-Trimerisierung innerhalb der Arenaviren konserviert ist, ist besonders interessant, da sich das Nukleoprotein des Lassavirus und des Tacaribevirus hinsichtlich ihrer biologischen Funktion signifikant voneinander unterscheiden. Neben der unterschiedlichen zellulären Verteilung (Abb. 42, Spalten 1 und 2), deren Bedeutung noch nicht näher geklärt ist, fungiert das NP des Lassavirus beispielsweise als Antagonist der Typ I Interferon-Antwort, was für das NP des Tacaribevirus nicht der Fall ist (Martinez-Sobrido et al., 2007). Zudem ist das NP des Tacaribevirus maßgeblich an der Bildung von Z-induzierten VLPs beteiligt, während das NP des Lassavirus keinerlei derartige Funktion hat (Groseth et al., 2011; Strecker et al., 2003). Dass die NP-Trimerisierung zwischen diesen beiden Viren trotz der unterschiedlichen Funktionen des NP dennoch konserviert ist, verdeutlicht die in dieser Arbeit beschriebene Bedeutung der NP-Trimerisierung (siehe 5.3) für den Replikationszyklus der Arenaviren.

Die Arenaviren haben wie auch die Orthomyxoviren (Bsp: Influenza-A-Virus) oder die Bunyaviren (Bsp.: RVFV) ein segmentiertes Genom. Die Aufteilung des Genoms in verschiedene Segmente ermöglicht die Bildung von Reassortanten, die durch den Austausch der Segmente zwischen verschiedenen Virus-Subtypen zustande kommt. Zu einem solchen Ereignis kann es z.B. während der Ko-Infektion eines Wirtes durch verschiedene Viren derselben Spezies kommen. Insbesondere für die Orthomyxoviren kann ein derartiger Austausch von Genom-Segmenten die Bildung von neuen, hochpathogenen Virus-Stämmen hervorrufen. In den meisten Fällen findet dieser Prozess allerdings zwischen verschiedenen Vertretern derselben Virusspezies statt. In einigen Fällen kann es jedoch auch zum Austausch zwischen verschiedenen Virus-Spezies kommen. Die Bildung derartiger Reassortanten kann artifiziell hervorgerufen werden (Rodriguez et al., 1998), sie kommt aber z.B. innerhalb der Bunyaviren auch in der Natur vor (Webster et al., 2011). Ein solches Phänomen des Segment-Austausches zwischen einzelnen Spezies wurde für die Arenaviren bisher nicht beschrieben. Untersuchungen zur Phylogenie der Neuwelt-Arenaviren deuten darauf hin, dass das Whitewater-Arroyo-Virus durch Rekombination zwischen verschiedenen Arenavirus-Spezies entstanden ist (Charrel et al., 2001). Allerdings betrifft dieser Vorgang die Rekombination zwischen zwei Genom-Segmenten desselben Types, der Austausch eines ganzen S- oder L- Segmentes (siehe 1.3.1) zwischen zwei Arenaviren konnte in der Natur nicht nachgewiesen werden.

Ein entscheidender Faktor, der zur Bildung von Arenavirus-Reassortanten beitragen kann, ist die Interaktion zwischen den Proteinen verschiedener Arenaviren. Der Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und dem Matrixprotein kommt dabei eine besondere Rolle zu, da durch sie das virale Genom mit der Virushülle verknüpft wird. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Interaktion zwischen dem NP und dem Z-Protein des Lassavirus

wurden daher auf die heterotypische Interaktion zwischen den Nukleoproteinen und den Matrixproteinen verschiedener Neu- und Altwelt-Arenaviren ausgeweitet. Die dazu durchgeführten Versuche zeigten, dass keinerlei Interaktionen zwischen dem NP des Lassavirus und den Z-Proteinen verschiedener Neuweltarenaviren stattfinden (Abb. 43). Eine Reassortanten-Bildung zwischen diesen Arenaviren ist somit auszuschließen, da die NP-Z-Interaktion ein dabei limitierender Faktor ist. Weiterhin impliziert diese Beobachtung, dass die an der NP-Z-Interaktion beteiligten Aminosäurebereiche des NP und/oder des Z-Proteins zwischen phylogenetisch weit entfernten Arenaviren nicht konserviert sind.

Im Gegensatz dazu zeigten die hier durchgeführten Studien, dass Interaktionen zwischen den Nukleoproteinen und Matrixproteinen verschiedener Neuweltarenavirus-Spezies durchaus möglich sind (Abb. 44). Diese Beobachtung ist auf den ersten Blick überraschend. Zwar sind die hier untersuchten Neuweltarenaviren Tacaribevirus, Juninvirus und Machupovirus sehr nahe miteinander verwandt (Abb. 2), allerdings unterscheiden sie sich nicht nur in zentralen Aspekten ihres Replikationszyklus (Choe et al., 2011; Martínez-Sobrido et al., 2009), sondern auch in ihren Reservoirwirten. Dass eine Interaktion zwischen NP und Z dieser Viren trotzdem möglich ist, weist auf die Konservierung der an der NP-Z-Interaktion beteiligten Proteindomänen und Aminosäuren hin. Darüber hinaus deuten diese Beobachtungen an, dass eine Bildung von Reassortanten zwischen näher verwandten Arenavirus-Spezies prinzipiell möglich wäre. Derartige Reassortanten konnten zwischen den nahe verwandten Altweltarenaviren Lassavirus und Mopeiavirus artifiziell erzeugt werden (Lukashevich, 1991). Zudem zeigen erst kürzlich veröffentlichte Studien, dass auch heterotypische Interaktionen zwischen dem Nukleoprotein des Lassavirus und dem Matrixprotein des ebenfalls zu den Altweltarenaviren gehörenden LCMV möglich sind (Ortiz-Riano et al., 2011).

Im Kontext dieser Beobachtungen zeigen die hier vorgestellten Untersuchungen, dass eine Bildung von Reassortanten zwischen diesen Viren möglich wäre. Es stellt sich aber die Frage, wie sich erklären lässt, dass derartige Reassortanten nicht natürlich aufzutreten scheinen. Dazu ist einerseits zu beachten, dass die verschiedenen Arenavirus-Spezies eine sehr unterschiedliche geographische Verbreitung aufweisen, die stark mit der Verbreitung der jeweiligen Wirtsspezies zusammenhängt. Allerdings kann dies nicht der einzige limitierende Faktor bei der Reassortanten-Bildung sein. Die Neuweltarenaviren Guanarivirus und Piritalvirus persistieren beispielsweise in zwei unterschiedlichen Nagerspezies, deren Habitate sich jedoch stark überschneiden. Dementsprechend konnte ein Transfer der verschiedenen Viren zwischen diesen Nagern beobachtet werden (Fulhorst et al., 1999). Zudem konnte experimentell nachgewiesen werden, dass manche Arenaviren dieselbe Wirtsspezies infizieren können (Webb et al., 1975). Allerdings kann die Interaktion zwischen anderen Arenavirus-Proteinen ein Faktor sein, der die Bildung von Reassortanten

verhindert: neben der NP-Z-Interaktion sind dies insbesondere die GP-Z sowie die NP-L-Interaktion. Da das Matrixprotein und die virale Polymerase L auf demselben Segment kodiert werden, ist davon auszugehen, dass diese Interaktion beim Austausch von Segmenten zwischen verschiedenen Arenaviren nicht beeinträchtigt wird. Für die GP-Z-Interaktion zeigen Studien an rekombinanten Juninviren, dass heterotypische Interaktionen sogar zwischen den Glykoproteinen und Matrixproteinen von Neu- und Altweltarenaviren möglich sind (Albarino et al., 2011). Die GP-Z-Interaktion ist somit vermutlich kein limitierender Faktor für die Bildung von inter-Spezies-Reassortanten. Kürzlich durchgeführte Studien an den Nukleoproteinen und Polymerase-Proteinen der Altweltarenaviren Lassavirus, Mopeiavirus und LCMV deuten aber darauf hin, dass die Kompatibilität des Nukleoproteins und der viralen Polymerase bei der Replikation des viralen Genoms die Bildung von Reassortanten begrenzen könnte (Kerber et al., 2011). Im Kontext eines Replicon-Systems konnten nur die Nukleoproteine des Lassavirus und des Mopeiavirus ausgetauscht werden. Wird das NP des LCMV durch jenes des Lassavirus ersetzt, findet keine Replikation mehr statt. Neben der NP und Z müssen also auch NP und L zueinander kompatibel sein, damit es zur Bildung von Arenavirus-Reassortanten kommt.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen, dass die für die NP-NP-Interaktion wichtigen Interaktionsflächen vermutlich zwischen allen Arenaviren konserviert sind, während dies für die NP-Z-Interaktion nur bei nahe verwandten Arenaviren der Fall ist. Darüber hinaus weisen die in dieser Arbeit durchgeführten Studien darauf hin, dass eine Bildung von Reassortanten zwischen verschiedenen Arenaviren möglich, jedoch auf nahe verwandte Spezies beschränkt ist. Die Kompatibilität des Nukleoproteins mit dem Matrixprotein Z (diese Arbeit) und der Polymerase L (Kerber et al., 2011) stellen neben der geographischen Verteilung der jeweiligen Virusspezies Faktoren dar, die die Bildung von Reassortanten begrenzen. Diese Beobachtungen sind für die Neuweltarenaviren von besonderer Bedeutung, da die hier vorgestellten Daten nahe legen, dass eine Rekombination zwischen dem für den Menschen apathogenen Tacaribevirus und dem hochpathogenen Junin- oder Machupovirus möglich sein könnte, sofern auch die Polymerase und das Nukleoprotein beider Viren kompatibel sind. Insbesondere die Tatsache, dass die Sonderstellung des Tacaribevirus als einziges Virus, das in Fledermäusen persistiert durch neue Untersuchungen in Frage gestellt wird (Cogswell-Hawkinson et al., 2012), impliziert dabei, dass es in der Zukunft durch Rekombination zwischen diesen Virusspezies zur Entstehung neuer, hochpathogener Arenaviren kommen könnte.

5.6 Schlussbetrachtung

In dieser Arbeit wurde die Oligomerisierung des NP, der Zusammenhang zwischen der NP-Oligomerisierung und den biologischen Funktionen des Proteins, sowie die Details der NP-Z – Interaktion untersucht. Zudem wurden speziesübergreifende NP-NP und NP-Z-Interaktionen analysiert.

Die dazu durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass das NP in Abwesenheit viraler RNA Trimere bildet. Diese Trimere sind ringförmig, symmetrisch und nicht mit RNA des Expressionswirts assoziiert. Der Vergleich mit der Struktur von viralen Nukleokapsiden legt nahe, dass sich die NP-Trimere bei der Bildung der viralen RNP-Komplexe umformen.

Für die Oligomerisierung des NP sind Aminosäuren im N- und im C-terminalen Bereich von essentieller Bedeutung. Darüber hinaus ergaben die hier vorgestellten Mutationsstudien, dass hydrophobe Aminosäuren innerhalb der N-terminalen Domäne für die NP-NP-Interaktion essentiell sind und vermutlich zur Stabilisierung der Kontaktfläche zwischen einzelnen NP-Monomeren beitragen.

Mittels verschiedener Testverfahren konnte gezeigt werden, dass die NP-Oligomerisierung essentiell für die Replikation und/oder Transkription des viralen Genoms ist. Im Gegensatz dazu spielt sie für die Interaktion mit dem Z-Protein und die Funktion des NP als Antagonist der Typ I Interferonantwort keine Rolle. Eine Subpopulation des NP wird vermutlich durch zelluläre Proteasen im N-terminalen Bereich gespalten. Die entstehenden Spaltprodukte liegen als Monomere vor und könnten während einer Virusinfektion die Funktion als Interferon-Antagonisten übernehmen und mit dem Z-Protein interagieren.

Die Analyse der NP-Z-Interaktion ergab, dass ein kleiner Bereich innerhalb der C-terminalen Domäne des NP für die Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und dem Matrixprotein von essentieller Bedeutung ist. Darüber hinaus ist die NP-Z-Interaktion direkt und wird nicht durch weitere zelluläre oder virale Proteine vermittelt. Dies bedeutet, dass die viralen Nukleokapsid-Komplexe direkt durch die Interaktion zwischen NP und Z in neu entstehende Virionen eingebaut werden.

Der Vergleich zwischen den Nukleoproteinen verschiedener Arenaviren zeigte, dass speziesübergreifende NP-NP-Interaktionen möglich sind, und dass die NP-Trimerisierung innerhalb der Arenaviren konserviert ist. Speziesübergreifende NP-Z – Interaktionen finden hingegen nur zwischen nahe verwandten Arenaviren statt und sind vermutlich ein limitierender Faktor bei der Bildung von Arenavirus-Reassortanten.

Auf Basis der gefundenen Zusammenhänge wurde ein Modell für die Rolle der NP-Oligomerisierung und der Interaktion mit dem Z-Protein im viralen Replikationszyklus erstellt (Abb. 51).

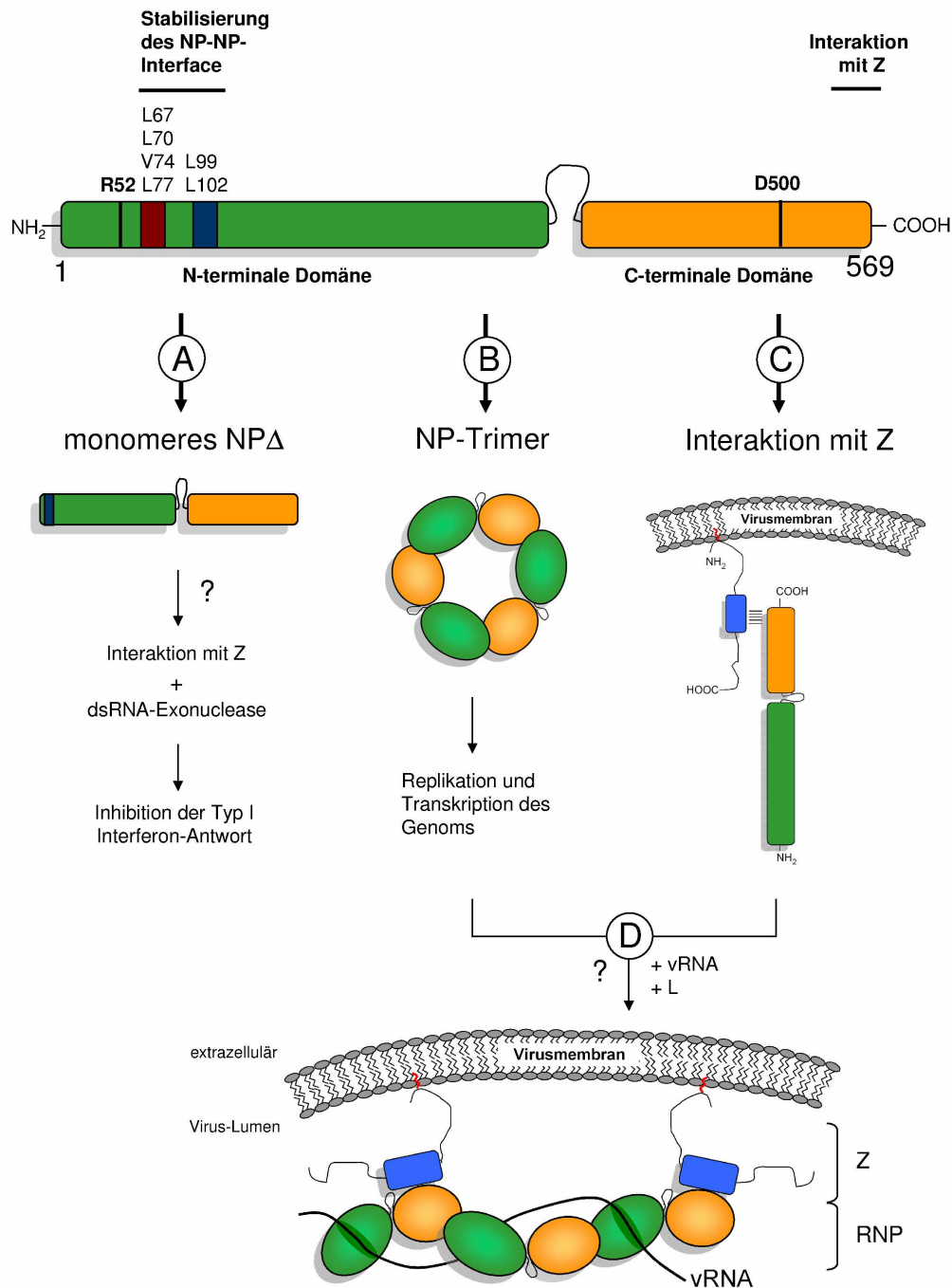


Abb. 51: Modell für die Funktion der NP-Oligomerisierung und der Interaktion mit dem Matrixprotein im viralen Replikationszyklus

Als Übersicht sind das Nukleoprotein des Lassavirus sowie die darin identifizierten, funktionellen Bereiche (schwarze Balken) gezeigt. **(A)** Das Nukleoprotein wird durch zelluläre Proteasen im N-terminalen Bereich gespalten. Das Spaltprodukt (NPΔ) liegt als Monomer vor und könnte die Funktion als Interferon-Antagonist übernehmen und mit dem Matrixprotein Z interagieren. **(B)** Das ungespaltene Nukleoprotein hingegen lagert sich zu Trimeren zusammen. Diese Trimere spielen eine entscheidende Rolle bei der Replikation und Transkription des viralen Genoms. **(C)** Zudem interagiert das Nukleoprotein über C-terminal gelegene Aminosäuren mit dem Matrixprotein und wird so an die virale Membran rekrutiert. **(D)** In Gegenwart von viraler RNA und/oder der viralen Polymerase L kommt es zu einer Umlagerung der Trimere und der Bildung von viralen RNP-Komplexen. Durch die Interaktion mit dem Z-Protein, das über eine Myristylierung membranverankert ist, werden diese RNPs an die Lipidmembran angelagert. Darüber hinaus interagiert das Z-Protein mit dem Signalpeptid und dem zytoplasmatischen Teil des Glykoprotein (hier nicht gezeigt).

6. Zusammenfassung

Das Nukleoprotein der Arenaviren erfüllt zentrale Aufgaben im viralen Replikationszyklus. Dazu gehört die Enkapsidierung des viralen Genoms und die Regulation von Transkription und Replikation sowie die Interaktion mit dem Matrixprotein und die Inhibition der Typ I Interferon-Antwort. Über die Homo-Oligomerisierung des Nukleoproteins, ihre Bedeutung für diese vier Aufgaben sowie die hierfür notwendigen Domänen innerhalb des Nukleoproteins war bisher nichts bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich das Nukleoprotein in Abwesenheit viraler RNA zu symmetrischen, ringförmigen Trimeren zusammenlagert. Die Bildung dieser Trimere ist unabhängig von posttranslationalen Modifikationen und ist innerhalb der Arenaviren konserviert. Mutationsanalysen ergaben, dass Bereiche innerhalb der N- und der C-terminalen Domäne kritisch für die Trimerisierung des Nukleoproteins sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Oligomerisierung des Nukleoproteins eine Grundvoraussetzung für seine Funktion bei der Replikation und Transkription des viralen Genoms ist. Im Gegensatz dazu spielt sie bei der Interaktion des Nukleoproteins mit dem Matrixprotein und für die Fähigkeit des Nukleoproteins zur Inhibition der Typ I Interferon-Antwort keine Rolle. Vermutlich wird das Nukleoprotein der Arenaviren durch Wirtszell-spezifische Proteasen in der N-terminalen Proteindomäne verkürzt. Die dabei entstehenden, großen Spaltfragmente liegen als Monomere vor und könnten in der infizierten Zelle die Funktion als Interferon-Antagonist übernehmen, während ungespaltenes Nukleoprotein für die Replikation, Transkription und Enkapsidierung des viralen Genoms verwendet wird.

Das Nukleoprotein sorgt durch seine Interaktion mit dem Matrixprotein für den Einbau des viralen Genoms in neu entstehende Virionen. In dieser Arbeit wurden die dafür verantwortlichen Aminosäurebereiche auf die letzten 19 C-terminalen Aminosäuren des Nukleoproteins eingegrenzt. Anhand dieser Untersuchungen wurde ein Modell für die Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und dem Matrixprotein an der Virusmembran aufgestellt. Vergleichende Studien zwischen den Nukleoproteinen und Matrixproteinen verschiedener Arenaviren ergaben zudem, dass heterotypische Interaktionen nur zwischen dem Nukleoprotein und dem Matrixprotein nahe verwandeter Arenaviren möglich sind. Die Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und dem Matrixprotein wurde somit als Faktor identifiziert, der die Bildung von Arenavirus-Reassortanten stark einschränkt.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen der Homo-Oligomerisierung und den biologischen Funktionen des Nukleoproteins aufgezeigt werden. Darüber hinaus wurden funktionelle Domänen für die NP-NP-Interaktion und die Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und dem Matrixprotein innerhalb des Nukleoproteins identifiziert.

7. Summary

The arenavirus nucleoprotein (NP) plays a central role during viral replication. It encapsidates the bi-segmented viral RNA-genome and is involved in regulating the viral transcription and replication. Furthermore, it interacts with the viral matrix protein and is responsible for the inhibition of type I interferon response during viral infection. Despite its importance for the replication of arenaviruses, no studies were available concerning either the homo-oligomerization of the nucleoprotein and its influence on the different functions of the nucleoprotein or the identification of functional domains within the nucleoprotein.

In the present study, it could be shown that the arenavirus nucleoprotein forms stable, ring-like trimers in the absence of viral RNA. The formation of these trimers is independent of post-translational modifications and conserved within the family *arenaviridae*. Amino acids in the N- and C-terminal domains have been identified to be critical for nucleoprotein trimerization. In addition, homo-oligomerization of the nucleoprotein is required for its function during replication and transcription of the viral genome. In contrast, NP self-interaction does not play any role for its interaction with the viral matrixprotein or inhibition of the type I interferon response. Besides this, the nucleoprotein is proteolytically truncated by cellular proteases at its N-terminus. The finding that large fragments resulting from this cleavage are no longer able to oligomerize suggests that they might function as inhibitors of the type I interferon response during viral replication, while uncleaved nucleoprotein is used for replication, transcription and encapsidation of the viral genome.

The nucleoprotein facilitates incorporation of the viral genome into budding virions through its binding to the viral matrix protein. In the present study, the last 19 C-terminal amino acids were identified to be crucial for this interaction. Based on these observations, a model for the association between NP and the matrix protein at viral membranes is proposed. The analysis of nucleoproteins and matrix proteins from different arenaviruses showed that heterotypic interactions are only possible when both proteins originate from closely related arenaviruses. Thus, the interaction between the nucleoprotein and the matrix protein has been identified as a factor limiting the formation of reassortants between different arenaviruses.

In summary, the present work shows the relationship between homo-oligomerization and the four known biological functions of the arenavirus nucleoprotein. Furthermore, functional domains responsible for homotypic nucleoprotein-nucleoprotein interactions and the interaction between the nucleoprotein and the matrix protein were identified.

8. Literatur

- Abraham, J., Kwong, J., Albariño, C., Lu, J., Radoshitzky, S., Salazar-Bravo, J., Farzan, M., Spiropoulou, C. and Choe, H. (2009) Host-species transferrin receptor 1 orthologs are cellular receptors for nonpathogenic new world clade B arenaviruses. *PLoS pathogens* **5**(4).
- Agnihothram, S., Dancho, B., Grant, K., Grimes, M., Lyles, D. and Nunberg, J. (2009) Assembly of arenavirus envelope glycoprotein GPC in detergent-soluble membrane microdomains. *J Virol* **83**(19), 9890-10790.
- Albarino, C.G., Bird, B.H., Chakrabarti, A.K., Dodd, K.A., White, D.M., Bergeron, E., Shrivastava-Ranjan, P. and Nichol, S.T. (2011) Reverse genetics generation of chimeric infectious Junin/Lassa virus is dependent on interaction of homologous glycoprotein stable signal peptide and G2 cytoplasmic domains. *J Virol* **85**(1), 112-22.
- Albertini, A.A., Wernimont, A.K., Muziol, T., Ravelli, R.B., Clapier, C.R., Schoehn, G., Weissenhorn, W. and Ruigrok, R.W. (2006) Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* **313**(5785), 360-3.
- Alfadhli, A., Love, Z., Arvidson, B., Seeds, J., Willey, J. and Barklis, E. (2001) Hantavirus nucleocapsid protein oligomerization. *J Virol* **75**(4), 2019-23.
- Alminait, A., Halttunen, V., Kumar, V., Vaheri, A., Holm, L. and Plyusnin, A. (2006) Oligomerization of hantavirus nucleocapsid protein: analysis of the N-terminal coiled-coil domain. *J Virol* **80**(18), 9073-81.
- Baize, S., Pannetier, D., Faure, C., Marianneau, P., Marendat, I., Georges-Courbot, M.C. and Deubel, V. (2006) Role of interferons in the control of Lassa virus replication in human dendritic cells and macrophages. *Microbes Infect* **8**(5), 1194-202.
- Barr, J.N. and Fearn, R. (2010) How RNA viruses maintain their genome integrity. *J Gen Virol* **91**(Pt 6), 1373-87.
- Basler, C.F., Wang, X., Mühlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H.D., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2000) The Ebola virus VP30 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22), 12289-94.
- Baum, A. and Garcia-Sastre, A. (2010) Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. *Amino Acids* **38**(5), 1283-99.
- Becker, S., Rinne, C., Hofsass, U., Klenk, H.D. and Mühlberger, E. (1998) Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology* **249**(2), 406-17.
- Borden, K.L., Campbell Dwyer, E.J. and Salvato, M.S. (1998) An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J Virol* **72**(1), 758-66.
- Borrow, P. and Oldstone, M. (1994) Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* **198**(1), 1-10.
- Bowen, M.D., Peters, C.J. and Nichol, S.T. (1997) Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Mol Phylogenet Evol* **8**(3), 301-16.
- Briese, T., Paweska, J.T., McMullan, L.K., Hutchison, S.K., Street, C., Palacios, G., Khristova, M.L., Weyer, J., Swanepoel, R., Egholm, M., Nichol, S.T. and Lipkin, W.I. (2009) Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa. *PLoS Pathog* **5**(5), e1000455.
- Brunotte, L., Kerber, R., Shang, W., Hauer, F., Hass, M., Gabriel, M., Lelke, M., Busch, C., Stark, H., Svergun, D.I., Betzel, C., Perbandt, M. and Günther, S. (2011a) Structure of the Lassa virus nucleoprotein revealed by X-ray crystallography, small-angle X-ray scattering, and electron microscopy. *J Biol Chem* **286**(44), 38748-56.
- Brunotte, L., Lelke, M., Hass, M., Kleinstaub, K., Becker-Ziaja, B. and Günther, S. (2011b) Domain structure of Lassa virus L protein. *J Virol* **85**(1), 324-33.
- Buchholz, U.J., Finke, S. and Conzelmann, K.K. (1999) Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* **73**(1), 251-9.
- Buckley, S.M. and Casals, J. (1970) Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus. *Am J Trop Med Hyg* **19**(4), 680-91.

- Burkhard, P., Stetefeld, J. and Strelkov, S.V.** (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* **11**(2), 82-8.
- Campbell Dwyer, E.J., Lai, H., MacDonald, R.C., Salvato, M.S. and Borden, K.L.** (2000) The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner. *J Virol* **74**(7), 3293-300.
- Cao, W., Henry, M.D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Compans, R.W., Campbell, K.P. and Oldstone, M.B.** (1998) Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**(5396), 2079-81.
- Capul, A., Perez, M., Burke, E., Kunz, S., Buchmeier, M. and de la Torre, J.** (2007) Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains. *J Virol* **81**(17), 9451-9511.
- Cardenas, W.B., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Hartman, A.L., Kimberlin, C.R., Martinez-Sobrido, L., Saphire, E.O. and Basler, C.F.** (2006) Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol* **80**(11), 5168-78.
- Carter, P. and Wells, J.A.** (1987) Engineering enzyme specificity by "substrate-assisted catalysis". *Science* **237**(4813), 394-9.
- Casabona, J.C., Livingston Macleod, J.M., Loureiro, M.E., Gomez, G.A. and Lopez, N.** (2009) The RING domain and the L79 residue of Z protein are involved in both the rescue of nucleocapsids and the incorporation of glycoproteins into infectious chimeric arenavirus-like particles. *J Virol* **83**(14), 7029-39.
- Casals, J., Buckley, S. and Cedeno, R.** (1975) Antigenic properties of the arenaviruses. *Bulletin of the World Health Organization* **52**(4-6), 421-428.
- Charrel, R.N., de Lamballerie, X. and Fulhorst, C.F.** (2001) The Whitewater Arroyo virus: natural evidence for genetic recombination among Tacaribe serocomplex viruses (family Arenaviridae). *Virology* **283**(2), 161-6.
- Choe, H., Jemielity, S., Abraham, J., Radoshitzky, S.R. and Farzan, M.** (2011) Transferrin receptor 1 in the zoonosis and pathogenesis of New World hemorrhagic fever arenaviruses. *Curr Opin Microbiol* **14**(4), 476-82.
- Clegg, J.** (1992) Current progress towards vaccines for arenavirus-caused diseases. *Vaccine* **10**(2), 89-184.
- Clegg, J., Wilson, S. and Oram, J.** (1991) Nucleotide sequence of the S RNA of Lassa virus (Nigerian strain) and comparative analysis of arenavirus gene products. *Virus Res* **18**(2-3), 151-215.
- Cogswell-Hawkinson, A., Bowen, R., James, S., Gardiner, D., Calisher, C.H., Adams, R. and Schountz, T.** (2012) Tacaribe Virus Causes Fatal Infection of An Ostensible Host, the Jamaican Fruit Bat. *J Virol*.
- Coloma, R., Valpuesta, J.M., Arranz, R., Carrascosa, J.L., Ortin, J. and Martin-Benito, J.** (2009) The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog* **5**(6), e1000491.
- Cordo, S., Cesio y Acuña, M. and Candurra, N.** (2005) Polarized entry and release of Junin virus, a New World arenavirus. *The Journal of general virology* **86**(Pt 5), 1475-1484.
- Cornu, T.I. and de la Torre, J.C.** (2001) RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome. *J Virol* **75**(19), 9415-26.
- Costa, G.L., Bauer, J.C., McGowan, B., Angert, M. and Weiner, M.P.** (1996) Site-directed mutagenesis using a rapid PCR-based method. *Methods Mol Biol* **57**, 239-48.
- Coulibaly-N'Golo, D., Allali, B., Kouassi, S.K., Fichet-Calvet, E., Becker-Ziaja, B., Rieger, T., Ölschlager, S., Dosso, H., Denys, C., Ter Meulen, J., Akoua-Koffi, C. and Gunther, S.** (2011) Novel arenavirus sequences in *Hylomyscus* sp. and *Mus* (*Nannomys*) *setulosus* from Cote d'Ivoire: implications for evolution of arenaviruses in Africa. *PLoS One* **6**(6), e20893.
- Cummins, D., McCormick, J.B., Bennett, D., Samba, J.A., Farrar, B., Machin, S.J. and Fisher-Hoch, S.P.** (1990) Acute sensorineural deafness in Lassa fever. *JAMA* **264**(16), 2093-6.

- Di Simone, C. and Buchmeier, M.** (1995) Kinetics and pH dependence of acid-induced structural changes in the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein complex. *Virology* **209**(1), 3-12.
- DiCarlo, A., Möller, P., Lander, A., Kolesnikova, L. and Becker, S.** (2007) Nucleocapsid formation and RNA synthesis of Marburg virus is dependent on two coiled coil motifs in the nucleoprotein. *Virol J* **4**, 105.
- Djavani, M., Rodas, J., Lukashevich, I.S., Horejsh, D., Pandolfi, P.P., Borden, K.L. and Salvato, M.S.** (2001) Role of the promyelocytic leukemia protein PML in the interferon sensitivity of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **75**(13), 6204-8.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. and Calos, M.P.** (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**(1), 379-87.
- Eichler, R., Lenz, O., Garten, W. and Strecker, T.** (2006) The role of single N-glycans in proteolytic processing and cell surface transport of the Lassa virus glycoprotein GP-C. *Virol J* **3**, 41.
- Eichler, R., Lenz, O., Strecker, T., Eickmann, M., Klenk, H.-D. and Garten, W.** (2003a) Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor. *EMBO reports* **4**(11), 1084-1092.
- Eichler, R., Lenz, O., Strecker, T. and Garten, W.** (2003b) Signal peptide of Lassa virus glycoprotein GP-C exhibits an unusual length. *FEBS letters* **538**(1-3), 203-209.
- Eichler, R., Strecker, T., Kolesnikova, L., ter Meulen, J., Weissenhorn, W., Becker, S., Klenk, H.D., Garten, W. and Lenz, O.** (2004) Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Res* **100**(2), 249-55.
- Ellenberg, P., Edreira, M. and Sclaro, L.** (2004) Resistance to superinfection of Vero cells persistently infected with Junin virus. *Archives of virology* **149**(3), 507-529.
- Fan, L., Briese, T. and Lipkin, W.I.** (2010) Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *J Virol* **84**(4), 1785-91.
- Ferron, F., Li, Z., Danek, E.I., Luo, D., Wong, Y., Coutard, B., Lantiez, V., Charrel, R., Canard, B., Walz, T. and Lescar, J.** (2011) The hexamer structure of Rift Valley fever virus nucleoprotein suggests a mechanism for its assembly into ribonucleoprotein complexes. *PLoS Pathog* **7**(5), e1002030.
- Fichet-Calvet, E., Lecompte, E., Koivogui, L., Soropogui, B., Dore, A., Kourouma, F., Sylla, O., Daffis, S., Koulemou, K. and Ter Meulen, J.** (2007) Fluctuation of abundance and Lassa virus prevalence in *Mastomys natalensis* in Guinea, West Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis* **7**(2), 119-28.
- Fisher-Hoch, S.P., Tomori, O., Nasidi, A., Perez-Oronoz, G.I., Fakile, Y., Hutwagner, L. and McCormick, J.B.** (1995) Review of cases of nosocomial Lassa fever in Nigeria: the high price of poor medical practice. *BMJ* **311**(7009), 857-9.
- Fisher, C.L. and Pei, G.K.** (1997) Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *BioTechniques* **23**(4), 570-1, 574.
- Folk, S., Steinbecker, S., Windmeyer, J., Macneil, A., Campbell, S. and Rollin, P.E.** (2011) Lymphocytic choriomeningitis with severe manifestations, missouri, USA. *Emerg Infect Dis* **17**(10), 1973-4.
- Fox, J.D. and Waugh, D.S.** (2003) Maltose-binding protein as a solubility enhancer. *Methods Mol Biol* **205**, 99-117.
- Froeschke, M., Basler, M., Groettrup, M. and Dobberstein, B.** (2003) Long-lived signal peptide of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein pGP-C. *J Biol Chem* **278**(43), 41914-41934.
- Fulhorst, C.F., Bowen, M.D., Salas, R.A., Duno, G., Utrera, A., Ksiazek, T.G., De Manzione, N.M., De Miller, E., Vasquez, C., Peters, C.J. and Tesh, R.B.** (1999) Natural rodent host associations of Guanarito and pirital viruses (Family Arenaviridae) in central Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* **61**(2), 325-30.
- Gallaher, W., DiSimone, C. and Buchmeier, M.** (2001) The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC microbiology* **1**, 1.
- Garcia, C.C., Djavani, M., Topisirovic, I., Borden, K.L., Salvato, M.S. and Damonte, E.B.** (2006) Arenavirus Z protein as an antiviral target: virus inactivation and protein oligomerization by zinc finger-reactive compounds. *J Gen Virol* **87**(Pt 5), 1217-28.

- Geisbert, T., Jones, S., Fritz, E., Shurtleff, A., Geisbert, J., Liebscher, R., Grolla, A., Ströher, U., Fernando, L., Daddario, K., Guttieri, M., Mothé, B., Larsen, T., Hensley, L., Jahrling, P. and Feldmann, H. (2005) Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS medicine* **2**(6).
- Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Mercier, R. and Pavé, A. (1980) Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Res* **8**(1), r49-r62.
- Groseth, A., Hoenen, T., Weber, M., Wolff, S., Herwig, A., Kaufmann, A. and Becker, S. (2011) Tacaribe virus but not junin virus infection induces cytokine release from primary human monocytes and macrophages. *PLoS Negl Trop Dis* **5**(5), e1137.
- Günther, S., Kühle, O., Rehder, D., Odaibo, G., Olaleye, D., Emmerich, P., ter Meulen, J. and Schmitz, H. (2001) Antibodies to Lassa virus Z protein and nucleoprotein co-occur in human sera from Lassa fever endemic regions. *Medical microbiology and immunology* **189**(4), 225-234.
- Günther, S. and Lenz, O. (2004) Lassa virus. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* **41**(4), 339-429.
- Hass, M., Golnitz, U., Muller, S., Becker-Ziaja, B. and Günther, S. (2004) Replicon system for Lassa virus. *J Virol* **78**(24), 13793-803.
- Hass, M., Westerkofsky, M., Müller, S., Becker-Ziaja, B., Busch, C. and Günther, S. (2006) Mutational analysis of the lassa virus promoter. *J Virol* **80**(24), 12414-9.
- Hastie, K., Kimberlin, C., Zandonatti, M., MacRae, I. and Saphire, E. (2011a) Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(6), 2396-2797.
- Hastie, K., Liu, T., Li, S., King, L., Ngo, N., Zandonatti, M., Woods, V., de la Torre, J. and Saphire, E. (2011b) Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(48):19365-19370
- Heinz, D.W., Baase, W.A. and Matthews, B.W. (1992) Folding and function of a T4 lysozyme containing 10 consecutive alanines illustrate the redundancy of information in an amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(9), 3751-5.
- Hock, M., Kraus, I., Schoehn, G., Jamin, M., Andrei-Selmer, C., Garten, W. and Weissenhorn, W. (2010) RNA induced polymerization of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* **397**(1), 64-72.
- Howard, C.R. and Buchmeier, M.J. (1983) A protein kinase activity in lymphocytic choriomeningitis virus and identification of the phosphorylated product using monoclonal antibody. *Virology* **126**(2), 538-47.
- Iapalucci, S., López, N. and Franze-Fernández, M. (1991) The 3' end termini of the Tacaribe arenavirus subgenomic RNAs. *Virology* **182**(1), 269-347.
- Iseni, F., Barge, A., Baudin, F., Blondel, D. and Ruigrok, R.W. (1998) Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol* **79** (Pt 12), 2909-19.
- Jacamo, R., Lopez, N., Wilda, M. and Franze-Fernandez, M.T. (2003) Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. *J Virol* **77**(19), 10383-93.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. and Akira, S. (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**(7089), 101-5.
- Kawaguchi, A., Momose, F. and Nagata, K. (2011) Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *J Virol* **85**(13), 6197-204.
- Kerber, R., Rieger, T., Busch, C., Flatz, L., Pinschewer, D.D., Kümmerer, B.M. and Günther, S. (2011) Cross-species analysis of the replication complex of old world arenaviruses reveals two nucleoprotein sites involved in L protein function. *J Virol* **85**(23), 12518-28.
- Klewitz, C., Klenk, H.-D. and ter Meulen, J. (2007) Amino acids from both N-terminal hydrophobic regions of the Lassa virus envelope glycoprotein GP-2 are critical for pH-dependent membrane fusion and infectivity. *J Gen Virol* **88**(Pt 8), 2320-2328.

- Kranzusch, P.J., Schenk, A.D., Rahmeh, A.A., Radoshitzky, S.R., Bavari, S., Walz, T. and Whelan, S.P. (2010) Assembly of a functional Machupo virus polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(46), 20069-74.
- Labudova, M., Tomaskova, J., Skultety, L., Pastorek, J. and Pastorekova, S. (2009) The nucleoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus facilitates spread of persistent infection through stabilization of the keratin network. *J Virol* **83**(16), 7842-7851.
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-5.
- Lecompte, E., Fichet-Calvet, E., Daffis, S., Koulémou, K., Sylla, O., Kourouma, F., Doré, A., Soropogui, B., Aniskin, V., Allali, B., Kouassi Kan, S., Lalis, A., Koivogui, L., Günther, S., Denys, C. and ter Meulen, J. (2006) *Mastomys natalensis* and Lassa fever, West Africa. *Emerg Infect Dis* **12**(12), 1971-1975.
- Lecompte, E., ter Meulen, J., Emonet, S., Daffis, S. and Charrel, R. (2007) Genetic identification of Kodoko virus, a novel arenavirus of the African pigmy mouse (*Mus Nannomys minotoides*) in West Africa. *Virology* **364**(1), 178-261.
- Lee, K.J., Novella, I.S., Teng, M.N., Oldstone, M.B. and de La Torre, J.C. (2000) NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol* **74**(8), 3470-7.
- Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H., Seidah, N. and Garten, W. (2001) The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22), 12701-12706.
- Leung, D.W., Prins, K.C., Borek, D.M., Farahbakhsh, M., Tufariello, J.M., Ramanan, P., Nix, J.C., Helgeson, L.A., Otwinowski, Z., Honzatko, R.B., Basler, C.F. and Amarasinghe, G.K. (2010) Structural basis for dsRNA recognition and interferon antagonism by Ebola VP35. *Nat Struct Mol Biol* **17**(2), 165-72.
- Leung, W., Ghosh, H. and Rawls, W. (1977) Strandedness of Pichinde virus RNA. *J Virol* **22**(1), 235-242.
- Levingston Macleod, J.M., D'Antuono, A., Loureiro, M.E., Casabona, J.C., Gomez, G.A. and Lopez, N. (2011) Identification of two functional domains within the arenavirus nucleoprotein. *J Virol* **85**(5), 2012-23.
- Lindemann, D., Pietschmann, T., Picard-Maureau, M., Berg, A., Heinkelein, M., Thurow, J., Knaus, P., Zentgraf, H. and Rethwilm, A. (2001) A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J Virol* **75**(13), 5762-5833.
- Lopez, N., Jacamo, R. and Franze-Fernandez, M.T. (2001) Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. *J Virol* **75**(24), 12241-51.
- Lukashevich, I.S., Maryankova, R., Vladyko, A.S., Nashkevich, N., Koleda, S., Djavani, M., Horejsh, D., Voitenok, N.N. and Salvato, M.S. (1999) Lassa and Mopeia virus replication in human monocytes/macrophages and in endothelial cells: different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression. *J Med Virol* **59**(4), 552-60.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A. and Mathur, E.J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**(1), 1-6.
- Lyu, P.C., Liff, M.I., Marky, L.A. and Kallenbach, N.R. (1990) Side chain contributions to the stability of alpha-helical structure in peptides. *Science* **250**(4981), 669-73.
- Marie, J.C., Saltel, F., Escola, J.M., Jurdic, P., Wild, T.F. and Horvat, B. (2004) Cell surface delivery of the measles virus nucleoprotein: a viral strategy to induce immunosuppression. *J Virol* **78**(21), 11952-61.
- Martínez-Sobrido, L., Emonet, S., Giannakas, P., Cubitt, B., García-Sastre, A. and de la Torre, J. (2009) Identification of amino acid residues critical for the anti-interferon activity of the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **83**(21), 11330-11370.
- Martínez-Sobrido, L., Giannakas, P., Cubitt, B., Garcia-Sastre, A. and de la Torre, J.C. (2007) Differential inhibition of type I interferon induction by arenavirus nucleoproteins. *J Virol* **81**(22), 12696-703.
- Martínez-Sobrido, L., Zúñiga, E., Rosario, D., García-Sastre, A. and de la Torre, J. (2006) Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **80**(18), 9192-9201.

- Martinez, M., Cordo, S. and Candurra, N.** (2007) Characterization of Junin arenavirus cell entry. *The Journal of general virology* **88**(Pt 6), 1776-1860.
- McCormick, J.B. and Fisher-Hoch, S.P.** (2002) Lassa fever. *Curr Top Microbiol Immunol* **262**, 75-109.
- McCormick, J.B., King, I.J., Webb, P.A., Johnson, K.M., O'Sullivan, R., Smith, E.S., Trippel, S. and Tong, T.C.** (1987) A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. *J Infect Dis* **155**(3), 445-55.
- McCormick, J.B., King, I.J., Webb, P.A., Scribner, C.L., Craven, R.B., Johnson, K.M., Elliott, L.H. and Belmont-Williams, R.** (1986) Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med* **314**(1), 20-6.
- Mir, M.A. and Panganiban, A.T.** (2006) The bunyavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone: possible roles in viral RNA panhandle formation and genome replication. *RNA* **12**(2), 272-82.
- Morin, B., Coutard, B., Lelke, M., Ferron, F., Kerber, R., Jamal, S., Frangeul, A., Baronti, C., Charrel, R., de Lamballerie, X., Vonnheim, C., Lescar, J., Bricogne, G., Günther, S. and Canard, B.** (2010) The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS Pathog* **6**(9), e1001038.
- Müller, S., Geffers, R. and Günther, S.** (2007) Analysis of gene expression in Lassa virus-infected HuH-7 cells. *The Journal of general virology* **88**(Pt 5), 1568-1643.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. and Sato, J.** (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**(9), 3858-63.
- Neuman, B.W., Adair, B.D., Burns, J.W., Milligan, R.A., Buchmeier, M.J. and Yeager, M.** (2005) Complementarity in the supramolecular design of arenaviruses and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis. *J Virol* **79**(6), 3822-30.
- Nguyen, T.L., Schoehn, G., Weissenhorn, W., Hermone, A.R., Burnett, J.C., Panchal, R.G., McGrath, C., Zaharevitz, D.W., Aman, M.J., Gussio, R. and Bavari, S.** (2005) An all-atom model of the pore-like structure of hexameric VP40 from Ebola: structural insights into the monomer-hexamer transition. *J Struct Biol* **151**(1), 30-40.
- Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J.** (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**(2), 193-9.
- O'Neil, K.T. and DeGrado, W.F.** (1990) A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* **250**(4981), 646-51.
- Oldstone, M. and Campbell, K.** (2011) Decoding arenavirus pathogenesis: essential roles for alpha-dystroglycan-virus interactions and the immune response. *Virology* **411**(2), 170-179.
- Ortiz-Riano, E., Cheng, B.Y., de la Torre, J.C. and Martinez-Sobrido, L.** (2011) The C-terminal region of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein contains distinct and segregable functional domains involved in NP-Z interaction and counteraction of the type I interferon response. *J Virol* **85**(24), 13038-48.
- Pasqual, G., Rojek, J., Masin, M., Chatton, J.-Y. and Kunz, S.** (2011) Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport. *PLoS Pathog* **7**(9).
- Perez, M., Craven, R.C. and de la Torre, J.C.** (2003) The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22), 12978-83.
- Perez, M. and de la Torre, J.C.** (2003) Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **77**(2), 1184-94.
- Perez, M., Greenwald, D.L. and de la Torre, J.C.** (2004) Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. *J Virol* **78**(20), 11443-8.
- Perry, A., Chen, G., Zheng, D., Tang, H. and Cheng, G.** (2005) The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res* **15**(6), 407-429.
- Peters, C.J.** (2006) Lymphocytic choriomeningitis virus--an old enemy up to new tricks. *N Engl J Med* **354**(21), 2208-11.
- Pinschewer, D., Perez, M. and de la Torre, J.** (2003) Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *J Virol* **77**(6), 3882-3889.

- Pinschewer, D.D., Perez, M. and de la Torre, J.C.** (2005) Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *J Virol* **79**(7), 4519-26.
- Price, J.L.** (1978) Serological evidence of infection of Tacaribe virus and arboviruses in Trinidadian bats. *Am J Trop Med Hyg* **27**(1 Pt 1), 162-7.
- Price, M.E., Fisher-Hoch, S.P., Craven, R.B. and McCormick, J.B.** (1988) A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy. *BMJ* **297**(6648), 584-7.
- Puthavathana, P., Auewarakul, P., Charoenying, P.C., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Boonnak, K., Khanyok, R., Thawachsupha, P., Kijphati, R. and Sawanpanyalert, P.** (2005) Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol* **86**(Pt 2), 423-33.
- Qi, X., Lan, S., Wang, W., Schelde, L., Dong, H., Wallat, G., Ly, H., Liang, Y. and Dong, C.** (2010) Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* **468**(7325), 779-862.
- Quirin, K., Eschli, B., Scheu, I., Poort, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A.** (2008) Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes. *Virology* **378**(1), 21-54.
- Radoshitzky, S.R., Abraham, J., Spiropoulou, C.F., Kuhn, J.H., Nguyen, D., Li, W., Nagel, J., Schmidt, P.J., Nunberg, J.H., Andrews, N.C., Farzan, M. and Choe, H.** (2007) Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* **446**(7131), 92-6.
- Raju, R., Raju, L., Hacker, D., Garcin, D., Compans, R. and Kolakofsky, D.** (1990) Nontemplated bases at the 5' ends of Tacaribe virus mRNAs. *Virology* **174**(1), 53-62.
- Raymond, D.D., Piper, M.E., Gerrard, S.R. and Smith, J.L.** (2010) Structure of the Rift Valley fever virus nucleocapsid protein reveals another architecture for RNA encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(26), 11769-74.
- Reguera, J., Weber, F. and Cusack, S.** (2010) Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS Pathog* **6**(9), e1001101.
- Reid, S.P., Cardenas, W.B. and Basler, C.F.** (2005) Homo-oligomerization facilitates the interferon-antagonist activity of the ebolavirus VP35 protein. *Virology* **341**(2), 179-89.
- Rodriguez-Carreno, M., Nelson, M., Botten, J., Smith-Nixon, K., Buchmeier, M. and Whitton, J.** (2005) Evaluating the immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding Lassa virus nucleoprotein. *Virology* **335**(1), 87-185.
- Rodriguez, L.L., Owens, J.H., Peters, C.J. and Nichol, S.T.** (1998) Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* **242**(1), 99-106.
- Rojek, J., Perez, M. and Kunz, S.** (2008a) Cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **82**(3), 1505-1522.
- Rojek, J., Sanchez, A., Nguyen, N., de la Torre, J.-C. and Kunz, S.** (2008b) Different mechanisms of cell entry by human-pathogenic Old World and New World arenaviruses. *J Virol* **82**(15), 7677-7764.
- Rudolph, M.G., Kraus, I., Dickmanns, A., Eickmann, M., Garten, W. and Ficner, R.** (2003) Crystal structure of the borna disease virus nucleoprotein. *Structure* **11**(10), 1219-26.
- Ruigrok, R.W., Crepin, T. and Kolakofsky, D.** (2011) Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Curr Opin Microbiol* **14**(4), 504-10.
- Saijo, M., Georges-Courbot, M.-C., Marianneau, P., Romanowski, V., Fukushi, S., Mizutani, T., Georges, A.-J., Kurata, T., Kurane, I. and Morikawa, S.** (2007) Development of recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **14**(9), 1182-1191.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**(4732), 1350-4.
- Salvato, M.S., Schweighofer, K.J., Burns, J. and Shimomaye, E.M.** (1992) Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Res* **22**(3), 185-98.
- Salvato, M.S. and Shimomaye, E.M.** (1989) The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology* **173**(1), 1-10.

- Sanchez, A.B. and de la Torre, J.C.** (2005) Genetic and biochemical evidence for an oligomeric structure of the functional L polymerase of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **79**(11), 7262-8.
- Schlie, K., Maisa, A., Freiberg, F., Groseth, A., Strecker, T. and Garten, W.** (2010a) Viral protein determinants of Lassa virus entry and release from polarized epithelial cells. *J Virol* **84**(7), 3178-88.
- Schlie, K., Maisa, A., Lennartz, F., Ströher, U., Garten, W. and Strecker, T.** (2010b) Characterization of Lassa virus glycoprotein oligomerization and influence of cholesterol on virus replication. *J Virol* **84**(2), 983-92.
- Schlie, K., Strecker, T. and Garten, W.** (2010c) Maturation cleavage within the ectodomain of Lassa virus glycoprotein relies on stabilization by the cytoplasmic tail. *FEBS Lett* **584**(21), 4379-82.
- Shtanko, O., Imai, M., Goto, H., Lukashevich, I.S., Neumann, G., Watanabe, T. and Kawaoka, Y.** (2010) A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. *J Virol* **84**(10), 5415-22.
- Shtanko, O., Watanabe, S., Jasenosky, L.D., Watanabe, T. and Kawaoka, Y.** (2011) ALIX/AIP1 is required for NP incorporation into Mopeia virus Z-induced virus-like particles. *J Virol* **85**(7), 3631-41.
- Spiropoulou, C.F., Kunz, S., Rollin, P.E., Campbell, K.P. and Oldstone, M.B.** (2002) New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J Virol* **76**(10), 5140-6.
- Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J., Weissenhorn, W., Dieter Klenk, H., Garten, W. and Lenz, O.** (2003) Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J Virol* **77**(19), 10700-5.
- Strecker, T., Maisa, A., Daffis, S., Eichler, R., Lenz, O. and Garten, W.** (2006) The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z. *Virol J* **3**, 93.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S.** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* **28**(10), 2731-2740.
- Ter Meulen, J., Lukashevich, I., Sidibe, K., Inapogui, A., Marx, M., Dorlemann, A., Yansane, M., Koulemou, K., Chang-Claude, J. and Schmitz, H.** (1996) Hunting of peridomestic rodents and consumption of their meat as possible risk factors for rodent-to-human transmission of Lassa virus in the Republic of Guinea. *Am J Trop Med Hyg* **55**(6), 661-667.
- Tortorici, M., Albariño, C., Posik, D., Ghiringhelli, P., Lozano, M., Rivera Pomar, R. and Romanowski, V.** (2001a) Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Res* **73**(1), 41-96.
- Tortorici, M., Ghiringhelli, P., Lozano, M., Albariño, C. and Romanowski, V.** (2001b) Zinc-binding properties of Junín virus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* **82**(Pt 1), 121-129.
- Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Yokosawa, H. and Yasuda, J.** (2006) Cellular factors required for Lassa virus budding. *J Virol* **80**(8), 4191-5.
- Urata, S., Yasuda, J. and de la Torre, J.C.** (2009) The z protein of the new world arenavirus tacaribe virus has bona fide budding activity that does not depend on known late domain motifs. *J Virol* **83**(23), 12651-5.
- Versteeg, G. and García-Sastre, A.** (2010) Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Cur Opin Microbiol* **13**(4), 508-524.
- Veza, A., Gard, G., Compans, R. and Bishop, D.** (1977) Structural components of the arenavirus Pichinde. *J Virol* **23**(3), 776-862.
- Volpon, L., Osborne, M.J., Capul, A.A., de la Torre, J.C. and Borden, K.L.** (2010) Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(12), 5441-6.
- Webb, P.A., Justines, G. and Johnson, K.M.** (1975) Infection of wild and laboratory animals with Machupo and Latino viruses. *Bull World Health Organ* **52**(4-6), 493-9.
- Webster, C.G., Reitz, S.R., Perry, K.L. and Adkins, S.** (2011) A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. *Virology* **413**(2), 216-25.

- Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L.J., Harrison, S.C., Skehel, J.J. and Wiley, D.C.** (1999) Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol* **16**(1), 3-9.
- Ye, Q., Krug, R.M. and Tao, Y.J.** (2006) The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* **444**(7122), 1078-82.
- Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Sato, M., Ozato, K. and Fujita, T.** (1996) Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). *J Biochem* **120**(1), 160-9.
- York, J., Romanowski, V., Lu, M. and Nunberg, J.** (2004) The signal peptide of the Junín arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *J Virol* **78**(19), 10783-10875.
- Young, P.R. and Howard, C.R.** (1983) Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids. *J Gen Virol* **64** (Pt 4), 833-42.
- Zhou, S., Cerny, A., Zacharia, A., Fitzgerald, K., Kurt-Jones, E. and Finberg, R.** (2010) Induction and inhibition of type I interferon responses by distinct components of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **84**(18), 9452-9514.

Anhang A1: Proteinbank-Zugriffsnummern für Arenavirus-Nukleoproteine

<u>Virusname</u>	<u>Uniparc-Zugriffsnummer</u>
Altwelt-Arenaviren	
Dandenong virus	B1NX59
Ippya virus	Q27YE3
Junin virus	P14239
Lassa virus	P13699
Lymphocytic choriomeningitis virus Stamm Armstrong	P09992
Machupo virus	P26578
Mobala virus	Q2A068
Mopeia virus	P19239
Lujo virus	C5ILC2
Neuwelt-Arenaviren	
Latino virus	Q8BDE6
Parana virus	Q8BDE5
Pichinde virus	P03541
Pirital virus	Q8BDE4
Sabia virus	Q90038
Tamiami virus	Q8BD31
Tacaribe virus	P18140
Whitewater Arroyo virus	Q91PB2
Allpahuayo virus	Q9DK04
Bear Canyon virus	A0PJ26
Chapare virus	B2C4J1
Cupixi virus	Q8BD28

Anhang A2: Sekundärstrukturvorhersage für das Nukleoprotein des Lassavirus

Die Sekundärstrukturvorhersage wurde mit dem Programm JPred durchgeführt. Pfeile markieren die erste (Mutanten $\Delta 1-86$, $\Delta 1-166$, $\Delta 1-227$ und $\Delta 1-312$) bzw. letzte (Mutanten $\Delta 341-569$, $\Delta 381-569$ und $\Delta 455-569$) Aminosäure der jeweiligen Mutante. H= α -Helix, B= β -Faltblatt

Sequenz	MSASKEIKSFLWTQSLRRELSGYCSNIKLQVVKDAQALLHGLDFSEVSNVQRL	-53
Struktur	-----HHHHHHHHHH--HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH--HHHHHHHH	
	<div style="text-align: center;">$\Delta 1-86$ └─┐</div>	
Sequenz	MRKERRDDNDLKRLRDLNQAVNNLVELKSTQQKSILRVGTLTSDDLLILAADL	-106
Struktur	HHH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH--BBBBB--HHHHHHHHHHHH	
Sequenz	EKLKSKVIRTERPLSAGVYMGNLSSQQLDQRRALLNMIGMSGGNQGARAGRDG	-159
Struktur	HHHHHHHHHH-----BB--HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----B	
	<div style="text-align: center;">$\Delta 1-166$ └─┐</div>	
Sequenz	VVRVWDVKNAELLNNQFGTMPSTLACLTKQGQVDLNDVQALTDLGLIYTAK	-212
Struktur	BBBBBB--HHHHH-----HHHHHHHHHHHH--HHHHHHHHHHHH--HHBBB--	
	<div style="text-align: center;">$\Delta 1-227$ └─┐</div>	
Sequenz	YPNTSDLDRLTQSHPIILNMIDTKKSSLNISGYNFSLGAAVKAGACMLDGGNML	-265
Struktur	-----HHHHHH-----BBB-----BBB-----HHHHHHHH--BB--BB	
	<div style="text-align: center;">$\Delta 1-312$ └─┐</div>	
Sequenz	ETIKVSPQTM DGILKSILKVKKALGMFISDTPGERNPYENILYKICLSGDGWP	-318
Struktur	BBBBB--HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----H-BBBBBB-----	
	<div style="text-align: center;">$\Delta 341-569$ └─┐</div>	
Sequenz	YIASRTSITGRAWENTVVDLES DGKPKQKADSNNSSKSLQSAGFTAGLTYSQLM	-371
Struktur	-BBB--BBBB-----BBBBB-----HHHHH	
	<div style="text-align: center;">$\Delta 381-569$ └─┐</div>	
Sequenz	TLKDAMLQLDPNAKTWMDIEGRPEDPVEIALYQPSSGCYIHFFREPTDLKQFK	-424
Struktur	HHHHHHHH-----BBBBB-----BBBBBBB-----BBBBBBB-----	
	<div style="text-align: center;">$\Delta 455-569$ └─┐</div>	
Sequenz	QDAKYSHGIDVTDLFATQPGLTSAVIDALPRNMVITCQGSDDIRKLLESQGRK	-477
Struktur	-----HHHH-----HHHHHHHHHH-----BBBB--HHHHHHHHHH-----	
Sequenz	DIKLIDIALSKTDSRKYENAVWDQYKDLCHMHTGVVVEKKKRGKKEEITPHCALMDCI	-535
Struktur	-BBBBBBBBB--HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH--BBB-----HHHHHHHH	
Sequenz	MFDAAVSGGLNTSVLR AVLPRDMVFRTSTPRVVL	-569
Struktur	HHHHHH-----BBB-----BBB--	

Parana virus	PALTIACMTEQGGETMNDVVQGLSALGLVYTVKFPNLDDLEKLSEQHPCLKSITQEQSQI	233
Flexal virus	PALTIACMTEQGGEGMNDVVQGLTALGLVYTVKFPNLDDLEKLTEQHPCLKLITQEQSQI	234
Pichinde virus	PALTIACMTEQGGEGQLNDVVQALSALGLLYTVKFPNMTDLEKLTQQHSALKIISHEPSAL	235
Allpahuayo virus	PALTIACMTEQGGEGMNDVVQGLTSLGLVYTVKYPNLSDELKLTSEKHPCLKLITQEPAQI	235
Pirital virus	PAVTMACMTEQGGESLNDVVQGLSALGLLYTVKYPNMSDLEKLADQYPCLGYITQEQSQI	234
Tamiami virus	PAVTISCMTEQGGETLNDVVQGLTDLGLLYTAKFPNLGDLEALSNNKHSCLKVITQEESQI	236
Whitewater Arroyo virus	PAVTISCMTEQGGESLNDVVQGLTDLGLLYTAKYPNLDLKLALTKHPSLNIIITQEESQI	236
Bear Canyon virus	PALTIACMTEQGGETLNDVVQGLTDLGLLYTAKYPNLDLEALSSEKHPCLKLITQEESQI	236
Junin virus	PALTIACMTVQGGETMNSVIALQALTSGLGLLYTVKYPNLSDDLRLTQEHDCQLIVTKDESSI	234
Machupo virus	PALTIACMTVQGGETMNSVVQALTSGLGLLYTVKYPNLDLKLTEHECLQIVTKDESSI	234
Tacaribe virus	PALTIACMTVQGGETMNNVVQALTSGLGLLYTVKYPNLSDDLKLIPNHECLQIITKEESSI	234
Cupixi virus	PALTIACMTVQGGETMNNVVQALTSGLGLLYTVKYPNLEDLEKLTQEHDCQLIITRDESAV	234
Guanarito virus	PALTIACMTVQGGETMNNVVQALTSGLGLLYTVKYPNLDLEKLTEHDCQLIITKDESAL	233
Sabia virus	PALTIACMTKQSDNTMGDVVQALTSGLGLLYTVKFPNLIDLEKLTAEHDCQLIVTKDESGL	233
Chapare virus	PALTIACMTVQGGDTMGNVVQALTSGLGLLYTVKFPNLADLEKLAAEHDCQLIITKDESAI	233
Latino virus	PALTIACMSVQGAEQMNDVVQGLTSLGLLYTVKYPNLDLKLSDKHPCLCFITKEESAN	235
Oliveros virus	PALTIACMSVQGAELNDVVQGLTTLGLLYTVKYPNLDLKLSEHDCQLCFITREESAN	234
Dandenong virus	PSLTMACMAKQAQTPLNDDVVQALTDLGLLYTVKYPNLSDDLRLKDKHPVLGVITEQQSSI	235
LCMV	PSLTMACMAKQSQTPLNDVVQALTDLGLLYTVKYPNLDLERLKDHPVLGVITEQQSSI	235
Mobala virus	PSLTTLACLCKQGGEDLSDVKALTDLGLVYTAKEPNLSDDLKLTHHPVLGLIDGNKSAI	238
Moepia virus	PSLTTLACMCKQGGEDLNDVQLSGLDLGLVYTAKEPNMSDDLKLSTQHPILGIIEPKSAI	239
Lassa virus	PSLTTLACLTKQGGVLDLNDVQALTDLGLIYTAKEPNSTDDLRLTQSHPIILNMIDTKKSSL	239
Ippy virus	PSLTTLACMSKQGGYELNDVVQSLTDLGLVYAAKEPNAMDEKLTAHPVLSIIDVSKSSI	239
Lujo virus	PSLTTLACLTRQTRVDLNDVQACVDLGLIYTAKEPNMDDLKLKNKHPVLVDYVSNCDSAI	234
Konservierung	***::** * .. :.. ***:*.**:** **.* : * : :	
Parana virus	NISGYNLSLSAAVKAGACMIDGGNMLETIKMSPPMFSSIIKAVLQVKNREQMFVSGVGQ	293
Flexal virus	NISGYNLSLSAAVKAGACMIDGGNMLETIKVSPSMFSTLIKTVLQVKNREGMFIAGNAGPQ	294
Pichinde virus	NISGYNLSLSAAVKAACMIDGGNMLETIQVKPSMFSTLIKSLQLIKNREGMFVSTTPGQ	295
Allpahuayo virus	NISGYNLSLSAAVKACMIDGGNMLETIQVKPSMFSTLIKTILEVKNREGMFVSPPGQ	295
Pirital virus	NVSGYNLSLSAAVKAGACMLDGGNMLETIQVKPTFMSSMIKAVLEVSKSKERMFVSEAPGQ	294
Tamiami virus	NISGFNLSLSAAVKAGACLVDGGNMLETIKVEESTFTTIKTLLLEIKSKERMFVDITPGQ	296
Whitewater Arroyo virus	NISGYNLSLSAAVKAGACLIDGGNMLETIKIEESTFTTVIKTLLEVKNKEKMFVSPTPGQ	296
Bear Canyon virus	NISGYNLSLSAAVKAGACLIDGGNMLETIKIDTSTFTTVIKTLLEVKNKEKMFVSPVPGQ	296
Junin virus	NISGYNFSLSAAVKAGASILDGGNMLETIRVTPDNFSSLIKSTIQVKRREGMFIDEKPGN	294
Machupo virus	NISGYNFSLSAAVKAGASILDGGNMLETIRVTPDNFSSLIKSTLQVKRKEGMFIDEKPGN	294
Tacaribe virus	NISGYNFSLSAAVKAGASILDGGNMLETIRVSPDNFSSSLIKSTLQVKRKEGMFIDDRPGS	294
Cupixi virus	NISGYNFSLSAAVKAGASILDGGNMLETIRVTPNNFSSIIKATLTKAKRENMFVDERPGN	294
Guanarito virus	NISGYNFSLSAAVKAGASILDGGNMLETIKVTNNFSSIVKAALNVKREGMFIDERPGN	294
Sabia virus	NISGYNYSLSAAVKAGATLLDGGNMLETIRITPDNFSQIKTTLISKKEGMFVDEKPGN	295
Chapare virus	NISGYNFSLSAAVKAGATFLDGGNMLETIKVTPDNFSITIKTLVLGVKKRENMFIDERPGN	295
Latino virus	NISGYNFSLSAAVKAGASILDGGNMLETILVKPDNFDIIVKSLVVKRKEGMFVNEKPGI	293
Oliveros virus	NISGYNLSLAAAVKAGACLVDGGNMLETIYVKPDVFADIKSLLRVKHQERMFVSEKPGM	294
Dandenong virus	NISGYNFSLGAAVKAGAALLDGGNMLESILIKPSNSEELLKAVLAGAKRKLNMFVSDQVGD	295
LCMV	NISGYNFSLGAAVKAGAALLDGGNMLESILIKPSNSEELLKAVLAGAKRKLNMFVSDQVGD	295
Mobala virus	NISGYNFSLNAAVKAGASLLDGGNMLETIKVTPKNIDTILKCVLKVRSVGMFVSDTPGE	298
Moepia virus	NISGYNFSLSAAVKAGACLIDGGNMLETIKVTNLEGIKALKVKRSLGMFVSDTPGE	299
Lassa virus	NISGYNFSLGAAVKAGACMLDGGNMLETIKVSPQTMGILKSLKVKKALGMFISDTPGE	299
Ippy virus	NVSGYNFSLSAAVKAGACMLDGGNMLETIKVTPQNLEDILASMLKVKRAHSMFVSDTPGD	299
Lujo virus	NISGYNLSLASLVKAGASLMKGGDMLETIELNSRNIDDIKATLTARNKVQMFVSEVPGE	294
Konservierung	***:* ** : *** * :...:***:: : : : ***.	
Parana virus	RNPYENLLYKLCLSGEGWPYIGRSQIVGRAWDNTLIDLEGKP-----AVSPPPVKNG	346
Flexal virus	RNPYENLLYKLCLSGEGWPYIGRSQVSGRAWDNSTIDIEGKP-----SPNHPPVRNG	347
Pichinde virus	RNPYENLLYKLCLSGDGWPIYIGRSQVQGRAWDNTTVDLDSKP-----SAIQPPVRNG	348
Allpahuayo virus	RNPYENILYKVLCSGDGWPIYIGRSQIKGRAWENTTVDLLEGKP-----SVNHPPVRNG	348
Pirital virus	RNPYENLLYKLCLSGDGWPIYIGRSQVKGRAWDNTTVDLTDG-----SPNHPPVRNG	347
Tamiami virus	RNPYENLLYKLCLSGEGWPYIASRSQIKGRAWDNTVIEFDVSP-----RKPPVPPIRNG	349
Whitewater Arroyo virus	RNPYENVLKLCLSGDGWPIYIASRSQVKGRAWDNNTVVEFDVSP-----RKPPVPPIRNG	349
Bear Canyon virus	RNPYENILYKLCLSGEGWPYIASRSQIKGRAWDNTVVEFDSAP-----PRAPVPVRNG	349
Junin virus	RNPYENLLYKLCLSGDGWPIYIGRSQIIGRSWDNTSIDLTRKP-----VAGPRQPEKNG	348
Machupo virus	RNPYENLLYKLCLSGDGWPIYIGRSQILGRSWDNSTVDLTKKP-----QVGRQPEKNG	348
Tacaribe virus	RNPYENLLYKLCLSGDGWPIYIGRSQIMGRSWDNSTVDLTKPDVPEGAAPRAERKNG	354
Cupixi virus	RNPYENLLYKVLCSGEGWPYIGRSQINGRSWDNTSVDLNPKP-----DPGPRPEKNG	348
Guanarito virus	RNPYENLLYKLCLSGEGWPYIGRSQILGRSWDNSTVDLNARP-----VTGPRPEKNG	348
Sabia virus	RNPYENLLYKLCLSGEGWPYIGRSQIKGRSWENTTVDLSTKP-----QQGPRTPPEKNG	349
Chapare virus	RNPYENLLYKLCLSGEGWPYIGRSQVKGRAWDNNTVVDLSKP-----TQGPAPEKNG	349
Latino virus	RNPYENILYKLCLSGEGWPYIGRSQIVGRAWDNTTVDLSEKVE-----VYGPAPEKNG	347
Oliveros virus	RNPYENILYKLCLSGEGWPYIGRSQITGRAWDNTTIDFSKDV-----MYGPPPPVKNG	348
Dandenong virus	RNPYENILYKVLCSGEGWPYIACRTSVVGRAWENTTIDLSGD-----KPVSSSPRSPGS	350
LCMV	RNPYENILYKVLCSGEGWPYIACRTSIVGRAWDNTTIDLTSE-----KPAVNSPRPAPGA	350
Mobala virus	RNPYENILYKLCLSGDGWPIYIACRTSISGRAWDNTVDLGTNKPDKIN-----GPPTSNTKAGA	357
Moepia virus	RNPYENLLYKLCLSGEGWPYIASRTSIVGRAWDNTTVDLSGDVQNAKPKDGNSNRLAQA	359
Lassa virus	RNPYENILYKLCLSGDGWPIYIASRTSITGRAWDNTVVDLESD-GKPQKADSNNSKSLQS	358
Ippy virus	RNPYENLLYKVLCSGNGWPIYIACRTSLTGRAWDNTVVDLGPPIDLSQNKQMSPAKPKGAG	359
Lujo virus	RNPYENLLYKLCLSGEGWPYISSRTSIKGRSWDNTVIDMTPK-----DPTPPQNERAKAP	349
Konservierung	*****:***:***:*****.*.:. :*:*** ::	

Parana virus	GPINLSPLSKGQEDLINQAVQKLSPKETTWIDIEGPAGDPVELAIYQPESGNYLHCYRAP	406
Flexal virus	GTPQINPLSRDQEDQVKGAVRLLDPKVTTWVDIEGPPGDLVEFAIFQPNSSGNYLHCYRRP	407
Pichinde virus	GSPDLKQIPKTEDEVIRAEIQELDPRGTTWVDIEGPPGDPVELALFQPETGNYLHCYRRP	408
Allpahuayo virus	GSPDLKQIPKTEDEVIRAEIQELDPRGTTWVDIEGPPGDPVELALFQPETGNYLHCYRRP	408
Pirital virus	GSPRLSQLSHAKEEQILEGLKRLDSKATTWIDIEGTPNDPVELAIFQPNSSGNYLHCYREP	407
Tamiami virus	GSPVLTTLKPEVEEQIKRSIESLSVHDTTWIDIEGPPDPVEMAIYQPDLSKYIHCYRKP	409
Whitewater Arroyo virus	GAPLLTTLKPEIQENQVVRKSVESLLINDTTWIDIEGPPNDPVEFAIYQPESQRYIHCYRRP	409
Bear Canyon virus	GAPLLGPLRPELEDQVRKGVESLSPNLTWIDIEGPPNDPVELAIYQPETQKYLHCYRRP	409
Junin virus	QNLRLANLTEIQEAVIREAVGKLDPTNTLWLDIEGPATDPVEMALFQPAQSKYIHCFRKP	408
Machupo virus	QNLRLANLTEMQEAVIKEAVKLDPTNTLWLDIEGPPTDPVELALYQPAKHYIHCFRKP	408
Tacaribe virus	QNLRLASLTGQELIVRAAISELDPSTIWLIDIEQLDPVELALYQPAKQYIHCYRKP	414
Cupixi virus	QNLRLSNLTEMQEAVIKEAMQKLDPTNTIWMIDIEGPPTDPVELAVFQPTSGYYIHCYRKP	408
Guanarito virus	QNLRLSNLSEMQEAVIKEAMKLDSSDTIWMIDIEGPPTDPVELAVFQPSGNYVHCYRKP	408
Sabia virus	QNLRLSNLSEMQEAVIKEAMKLDSSDTIWMIDIEGPPTDPVELAVFQPSGNYVHCYRKP	408
Chapare virus	QNLRLSNLSEMQEAVIKEAMKLDSSDTIWMIDIEGPPTDPVELAVFQPSGNYVHCYRKP	409
Latino virus	GNMRLSPLSDTQEAVIKEAIGKLDMDETIWMIDIEGPPNDPVELAIYQPTSGNYIHCYRKP	407
Oliveros virus	GNMRLSPLSDTQEAVIKEAIGKLDMDETIWMIDIEGPPNDPVELAIYQPTSGNYIHCYRKP	407
Dandenong virus	GNMRLSPLSDTQEAVIKEAIGKLDMDETIWMIDIEGPPNDPVELAIYQPTSGNYIHCYRKP	408
LCMV	AGPPQVGLSYSQTMMLKDLMSGIDNPATWIDIEGRFNDPVEIAIFQPPQNGQFIHFYREP	410
Mobala virus	AGPPQVGLSYSQTMMLKDLMSGIDNPATWIDIEGRFNDPVEIAIFQPPQNGQFIHFYREP	410
Mopeia virus	AGFN-AGLTYSQMMELKDSMLQIDPTAKTWVDIEGRADDPVEIAIYQPSNGHYIHFYREP	416
Lassa virus	QGMF-AGLTYSQTMELKDSMLQIDPNNAKTWIDIEGRPEDPVEIAIYQPNNGQYIHFYREP	418
Ippy virus	AGFT-AGLTYSQTMELKDSMLQIDPNNAKTWIDIEGRPEDPVEIAIYQPNNGQYIHFYREP	417
Lujo virus	HGMP-SGLTYSQTMELKDSMLQIDPNNAKTWIDIEGRPEDPVEIAIYQPNNGQYIHFYREP	418
Konservierung	HQFP-VGVVSFSQSQLDDIMKNLNPKGRTWMDIEGRPDDPVEIAIFQPEERLCLHFYREP	408
	: : : : * : * : * : * : * : *	

Parana virus	HNEQSAFKDQSKYSHGILLKDLKAARPGLSAIIKALPKGMVLTAAQGSDDIEQLILMHGRR	466
Flexal virus	HNEQSAFKDQSKYSHGILLKDLKAARPGLSAIIKALPKGMVLTAAQGSDDIEQLILMHGRR	467
Pichinde virus	HDEKSFKEQSKYSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	468
Allpahuayo virus	HNEAFKQSKYSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	468
Pirital virus	HDVKSFKDQSKYSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	467
Tamiami virus	NDVKSFKDQSKYSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	469
Whitewater Arroyo virus	NDVKSFKDQSKYSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	469
Bear Canyon virus	NDVKSFKDQSKYSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	469
Junin virus	NDVKSFKDQSKYSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	469
Machupo virus	HDEKGFKNRSHSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	468
Tacaribe virus	HDEKGFKNRSHSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	474
Cupixi virus	HDEKGFKNRSHSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	468
Guanarito virus	HDEKGFKNRSHSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	468
Sabia virus	HDEKGFKNRSHSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	469
Chapare virus	HDEKGFKNRSHSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	469
Latino virus	HDEKGFKNRSHSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	467
Oliveros virus	HDEKGFKNRSHSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	468
Dandenong virus	HDEKGFKNRSHSHGILLKDLADAPGLISSIIIRHLPQNMVFTAQGSDDIIRLFEMHGRR	470
LCMV	VDQKQFKQDSKYSHGMDLADLFNAQPGLTSSVIGALPQGMVLSQGSDDIRKLLDSQNRK	470
Mobala virus	TDIKQFKQDSKYSHGMDLADLFNAQPGLTSSVIGALPQGMVLSQGSDDIRKLLDSQNRK	476
Mopeia virus	TDIKQFKQDSKYSHGMDLADLFNAQPGLTSSVIGALPQGMVLSQGSDDIRKLLDSQNRK	478
Lassa virus	TDIKQFKQDSKYSHGMDLADLFNAQPGLTSSVIGALPQGMVLSQGSDDIRKLLDSQNRK	477
Ippy virus	TDIKQFKQDSKYSHGMDLADLFNAQPGLTSSVIGALPQGMVLSQGSDDIRKLLDSQNRK	478
Lujo virus	TDIKQFKQDSKYSHGMDLADLFNAQPGLTSSVIGALPQGMVLSQGSDDIRKLLDSQNRK	468
Konservierung	: . * : : . . * : . : . * : : : * * * : * : * : *	

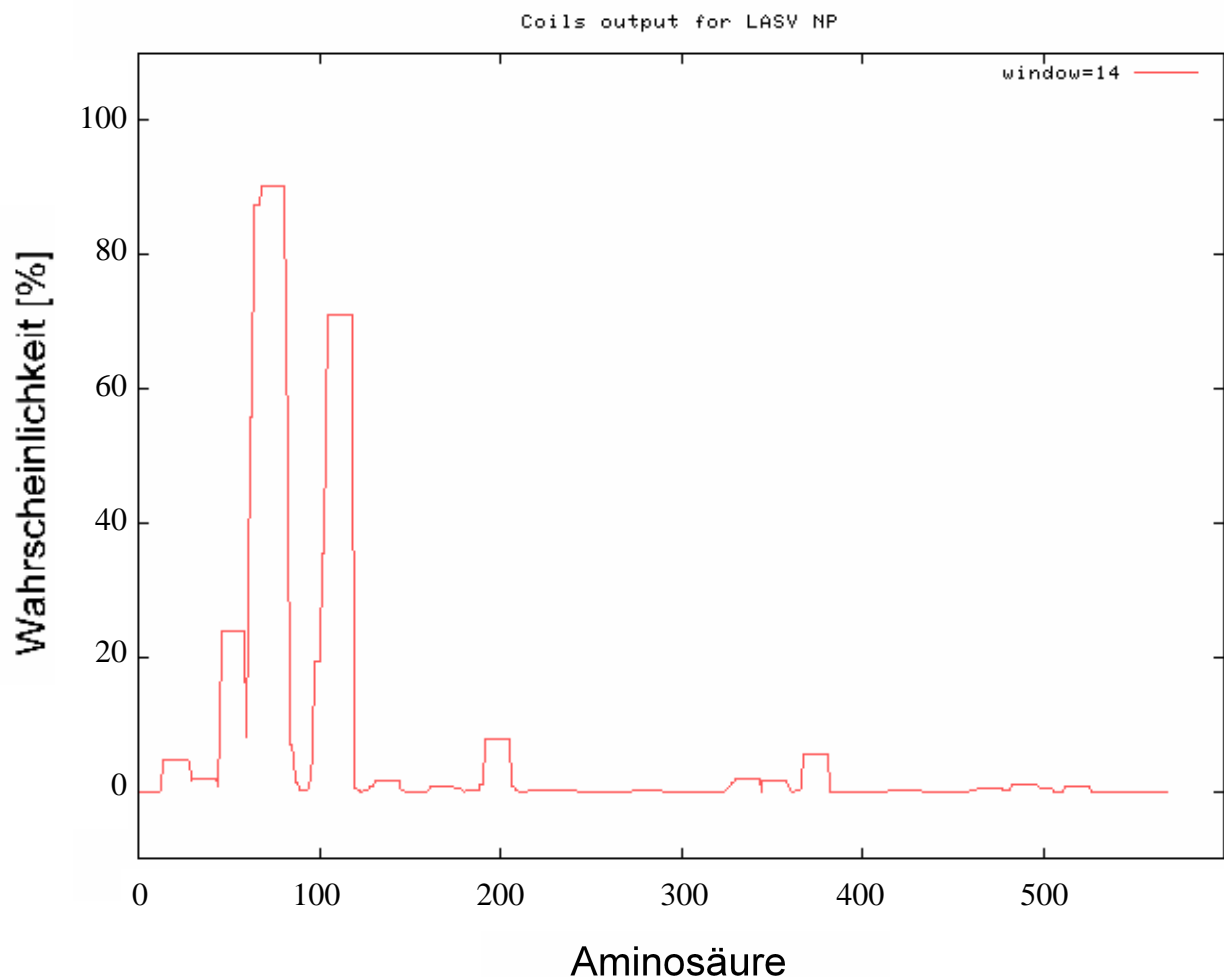
Parana virus	DIKVVVDVLTSEHARVFEDPVWDRFNPPLCEKHTGLVIKKKKKGAPPS---STNPHCALL	522
Flexal virus	DLKVVVDVLTSEHARVFEDPVWDRFNPPLCEKHTGLVIKKKKKGAPPS---STNPHCALL	523
Pichinde virus	DLKVVVDVLTSEHARVFEDPVWDRFNPPLCEKHTGLVIKKKKKGAPPS---STNPHCALL	524
Allpahuayo virus	DIKVVVDVLTSEHARVFEDPVWDRFNPPLCEKHTGLVIKKKKKGAPPS---STNPHCALL	524
Pirital virus	DISIIDVRLTSEHARVFEDPVWDRFNPPLCEKHTGLVIKKKKKGAPPS---STNPHCALL	523
Tamiami virus	DLKIVDVKFTAEQSRVFEELTWKRFHEHLCDKHKGIVIKSKKKKGTPA---STNAHCALM	525
Whitewater Arroyo virus	DLKIVDVKFTAEQSRVFEELTWKRFHEHLCDKHKGIVIKSKKKKGTPA---STNAHCALM	525
Bear Canyon virus	DLKIVDVKFTAEQSRVFEELTWKRFHEHLCDKHKGIVIKSKKKKGTPA---STNAHCALM	525
Junin virus	DLKIVDVKFTAEQSRVFEELTWKRFHEHLCDKHKGIVIKSKKKKGTPA---STNAHCALM	528
Machupo virus	DLKIVDVKFTAEQSRVFEELTWKRFHEHLCDKHKGIVIKSKKKKGTPA---STNAHCALM	528
Tacaribe virus	DLKIVDVKFTAEQSRVFEELTWKRFHEHLCDKHKGIVIKSKKKKGTPA---STNAHCALM	534
Cupixi virus	DLKIVDVKFTAEQSRVFEELTWKRFHEHLCDKHKGIVIKSKKKKGTPA---STNAHCALM	524
Guanarito virus	DLKIVDVKFTAEQSRVFEELTWKRFHEHLCDKHKGIVIKSKKKKGTPA---STNAHCALM	524
Sabia virus	DLKIVDVKFTAEQSRVFEELTWKRFHEHLCDKHKGIVIKSKKKKGTPA---STNAHCALM	526
Chapare virus	DLKIVDVKFTAEQSRVFEELTWKRFHEHLCDKHKGIVIKSKKKKGTPA---STNAHCALM	526
Latino virus	DIATIDMSFSDQARFYESVWVEKFGSLCTKHNGVVLSSRKKKGNS-----GEPHCALL	521
Oliveros virus	DIATIDMSFSDQARFYESVWVEKFGSLCTKHNGVVLSSRKKKGNS-----GEPHCALL	522
Dandenong virus	DIATIDMSFSDQARFYESVWVEKFGSLCTKHNGVVLSSRKKKGNS-----GEPHCALL	521
LCMV	DIATIDMSFSDQARFYESVWVEKFGSLCTKHNGVVLSSRKKKGNS-----GEPHCALL	521
Mobala virus	DIATIDMSFSDQARFYESVWVEKFGSLCTKHNGVVLSSRKKKGNS-----GEPHCALL	531
Mopeia virus	DIATIDMSFSDQARFYESVWVEKFGSLCTKHNGVVLSSRKKKGNS-----GEPHCALL	533
Lassa virus	DIATIDMSFSDQARFYESVWVEKFGSLCTKHNGVVLSSRKKKGNS-----GEPHCALL	532
Ippy virus	DIATIDMSFSDQARFYESVWVEKFGSLCTKHNGVVLSSRKKKGNS-----GEPHCALL	533
Lujo virus	DIATIDMSFSDQARFYESVWVEKFGSLCTKHNGVVLSSRKKKGNS-----GEPHCALL	522
Konservierung	* : * : : * : * : * : * : * : *	

Konservierung

- * = vollständige Konservierung
- : = hohe Konservierung
- . = schwache Konservierung

Anhang A4: Vorhersage über *coiled-coils* im Nukleoprotein des Lassavirus

Zur Vorhersage von *Coiled coils* wurde das Programm Coils verwendet (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html). Als Eingabesequenz wurde die Aminosäuresequenz des Lassavirus-Nukleoproteins (Stamm Josiah, Uniparc-Zugriffsnummer P13699) verwendet. Auf der Ordinate ist die Wahrscheinlichkeit abgebildet, mit der die Aminosäuresequenz an der Bildung einer *Coiled-coil*-Struktur beteiligt ist.



Anhang A5: Übersicht über die für das Replicon-System verwendeten Konstrukte

Die entsprechenden Versuche wurden durch Dipl. Biol. Maria Lehmann am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt. Die Abbildungen sind modifiziert nach Hass et al, 2004.

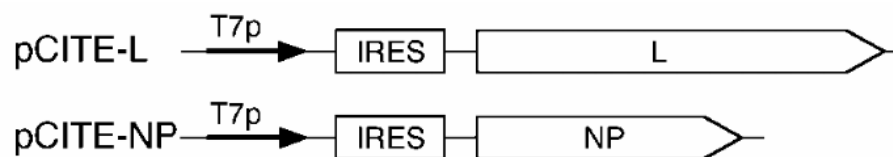


Abb. A-1: Konstrukte zur Proteinexpression im Replicon-System

IRES = internal ribosomal entry site, T7p = T7-Promotor L = Gen für die Polymerase L, NP = Gen für das Nukleoprotein. Entnommen aus Hass et al, 2004

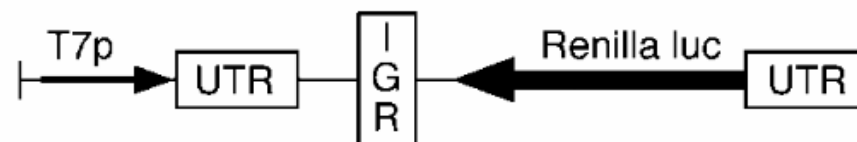


Abb. A-2: Konstrukte zur Herstellung von *run-off* – Transkripten des Minigenoms

schematisch abgebildet ist das Konstrukt, welches zur Herstellung von *run-off* – Transkripten des Minigenoms verwendet wird. T7p = T7-Promotor, UTR = untranslatierte region, IGR = intergenische Region, Renilla luc = Gen für die *Rennila*-Luciferase. Entnommen aus Hass et al, 2004

Anhang A6: Abkürzungsverzeichnis

Alix/A1P	<i>ALG-2-interacting protein X</i>	GP-2	carboxyterminales Spaltprodukt des Glykoproteins
Å	Ångstrom		
APS	Ammoniumpersulfat	GPC	ungespaltener Vorläufer des Glykoprotein
AS	Aminosäure		
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	HA	Hämagglutinin
		HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
bp	Basenpaare	HR-Luc	<i>Renilla</i> -Luciferase
BSA	bovines Serumalbumin	hTfR1	humaner Transferrin 1 – Rezeptor
CMV	Cytomegalievirus	HuH	Humane Hepatoma-Zellen
COIP	Ko-Immunpräzipitation		
C-terminal	carboxyterminal	IGR	intergenische Region
		IFN	Interferon
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	IP	Immunpräzipitation
DMSO	Dimethylsulfoxid	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
dsRNA	doppelsträngige RNA	IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
EBOV	Ebolavirus		
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	JCRB	<i>Japanese Collection of Research Bioresources</i>
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure		
		JUNV	Junivirus
eIF4E	<i>eucaryotic translation initiation factor 4E</i>	kDa	Kilodalton
ER	endoplasmatisches Retikulum	KP-Virus	Virus der klassischen Geflügelpest
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>	LASV	Lassavirus
		LCMV	Lymphozytäres-Choriomeningitis-Virus
		L-Protein	Polymerase der Arenaviren
FCS	Fötales Kälberserum		
FITC	Fluoresceinisothiocyanat		
FluA	Influenza A	MACV	Machupovirus
FF-luc	<i>Firefly</i> -Luciferase	MBP	Maltose Bindungs-Protein
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>	MCS	<i>multiple cloning site</i>
		MG	Minigenom
		mRNA	<i>messenger RNA</i>
GP	Glykoprotein	MVB	<i>Multivesicular body</i>
GP-1	aminoterminal		
	Spaltprodukt des Glykoproteins	NP	Nukleoprotein
		N-terminal	aminoterminal

NTP	Nukleosid-Triphosphat	SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
OD	Optische Dichte	SKI-1/S1P	<i>Subtilisin Kexin Isozyme-1/Site-1 Protease</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>	SPase	Signalpeptidase
		sSP	stabiles Signalpeptid
PAGE	Polyacrylamid Gel-Elektrophorese	SV40	<i>Simian Virus 40</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	TBE	Tris-Borat-EDTA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	TCRV	Tacaribevirus
PDB	<i>Protein Data Bank</i>	TEMED	N, N, N', N' -
PFA	Paraformaldehyd		Tetramethylethylendiamin
PML	<i>Promyelocyte leukemia protein</i>	TNE	Tris-Natrium -EDTA
		tRNA	Transfer-RNA
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid	Tsg101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
präGPC	Glykoprotein-Vorläufer		
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>	UV	Ultraviolett
		VLP	<i>Virus-like Particle</i>
RB	<i>Rich Broth</i>	VP35	<i>Virus Protein 35</i> des Ebolavirus
RIG-I	<i>Retinoic Acid-Inducible Gene I</i>	VP40	<i>Virus Protein 40</i> des Ebolavirus
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>	VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
RNA	Ribonukleinsäure		
RNP	Ribonukleoproteinkomplex		
rLuc	<i>Renilla-Luciferase</i>	Wb	<i>Western Blot</i>
RVFV	<i>Rift Valley fever virus</i>	wt	Wildtyp
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase	Z-Protein	Matrixprotein der Arenaviren

Abkürzungen der Aminosäuren im Ein- und Drei-Buchstaben-Code

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

Anhang A7: Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Geographische Verbreitung der Arenaviren	1
Abb.2	Phylogenetischer Stammbaum einiger Vertreter der Familie <i>Arenaviridae</i>	2
Abb.3	Ultrastruktur der Arenaviren	5
Abb.4	Organisation und Replikation des Genoms der Arenaviren	6
Abb.5	Strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Z-Proteins	8
Abb.6	Strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Glykoproteins	9
Abb.7	Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Polymerase	10
Abb.8	Schematischer Überblick über den Replikationszyklus der Arenaviren	13
Abb.9	Strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Nukleoproteins	15
Abb.10	Röntgenkristallstruktur des Nukleoprotein-Monomers des Lassavirus	19
Abb.11	Schematische Darstellung des in <i>E.coli</i> exprimierten Fusionsproteins	51
Abb.12	Expression und Reinigung des MBP-NP Fusionsproteins	52
Abb.13	Gelfiltrationschromatographie zur Trennung von MBP und NP	54
Abb.14	Trimerisierung von bakteriell exprimiertem NP	55
Abb.15	Trimerisierung von eukaryotisch exprimiertem NP	56
Abb.16	Elektronenmikroskopische Untersuchung von rekombinantem, bakteriell exprimiertem NP	58
Abb.17	Detektion von spezifischen Spaltfragmenten des wildtypischen Nukleoproteins	59
Abb.18	Auftrennung der Spaltfragmente des wildtypischen Nukleoproteins	60
Abb.19	Interaktion von wildtypischem NP mit N-terminalen Deletionsmutanten	63
Abb.20	Interaktion von wildtypischem NP mit C-terminalen Deletionsmutanten	65
Abb.21	Alanin-Substitutionsmutanten zur Untersuchung der NP-NP-Interaktion	67
Abb.22	Alanin-Substitutionsmutanten im N- und C-terminalen Bereich des NP	69
Abb.23	Interaktion zwischen wildtypischem NP und Alanin-Substitutionsmutanten	69
Abb.24	Intrazelluläre Verteilung der Alanin-Substitutionsmutanten	71
Abb.25	Oligomerisierung verschiedener NP-Mutanten	72
Abb.26	Prinzip des Replicon-Systems	75
Abb.27	Aktivität der Alanin-Substitutionsmutanten und der Mutante NP Δ 1-86 im Lassavirus Replicon-System	76
Abb.28	Einbau von Alanin-Substitutionsmutanten und der Mutante NP Δ 1-86 in Z-induzierte VLPs	78
Abb.29	Prinzip des Interferon-Induktionsnachweises	80

Abb.30	Inhibition der zellulären Interferon-Antwort durch Alanin-Substitutionsmutanten und die Mutanten NP Δ 1-86	81
Abb.31	Konstrukte zur Untersuchung der NP-Z-Interaktion	82
Abb.32	Interaktion von NP-Wildtyp und NP-Deletionsmutanten mit wildtypischem Matrixprotein	83
Abb.33	Einbau von NP-Wildtyp und NP-Deletionsmutanten in Z-induzierte VLPs	84
Abb.34	Protease-Protektionsversuch mit NP-Z-VLPs	85
Abb.35	C-terminale Deletionsmutanten zur genauen Untersuchung der NP-Z-Interaktion	86
Abb.36	Interaktion von NP-Wildtyp und C-terminalen NP-Deletionsmutanten mit wildtypischem Matrixprotein	87
Abb.37	Intrazelluläre Verteilung der C-terminalen Deletionsmutanten	88
Abb.38	Einbau von NP-Wildtyp und C-terminalen NP-Deletionsmutanten in Z-induzierte VLPs	89
Abb.39	Protease-Protektionsversuch mit NP-Z-VLPs	90
Abb.40	Interaktion von bakteriell exprimertem Nukleoprotein und Matrixprotein	92
Abb.41	Interaktion zwischen Nukleoproteinen der Neu- und Altweltarenaviren	94
Abb.42	Umverteilung des LASV NP in TCRV NP - induzierte Einschlusskörperchen	96
Abb.43	Interaktion zwischen Lassavirus-NP und Matrixproteinen verschiedener Arenaviren	98
Abb.44	Interaktion zwischen Nukleoproteinen und Matrixproteinen verschiedener Arenaviren	99
Abb.45	Protease-Protektionsversuch mit NP-Z-VLPs	100
Abb.46	Vergleich zwischen der Ultrastruktur der NP-Trimere und dem Modell des kristallographischen NP-Trimers für die Nukleoproteine des Lassavirus und des Influenza-A-Virus	102
Abb.47	Nukleoproteine und Nukleokapside verschiedener Negativ-Strang RNA-Viren	203
Abb.48	Lage der Helices α 4 und α 5 innerhalb der Struktur des monomeren NP	107
Abb.49	Lage der Helices α 3, α 4, α 5 und α 17 innerhalb der Struktur des monomeren NP	109
Abb.50	Modell für die NP-Z-Interaktion an der Virusmembran	118
Abb.51	Modell für die Funktion der NP-Oligomerisierung und der Interaktion mit dem Matrixprotein im viralen Replikationszyklus	124

Veröffentlichungen

Fehling SK, Lennartz F, Strecker T

The Multifunctional Nature of Arenavirus RING Finger Proteins
Viruses (in Vorbereitung)

Lennartz F, Hoenen T, Groseth A, Lehmann M, Günther S, Garten W

The role of nucleoprotein oligomerization for the biological functions of the arenavirus nucleoprotein
PloS ONE (in Vorbereitung)

Schlie K, Maisa A, Lennartz F, Ströher U, Garten W and Strecker T

Characterization of Lassa virus glycoprotein oligomerization and influence of cholesterol on virus replication.
Journal of Virology 2010, 84: 983-92.

Vorträge

Assembly of Lassavirus and polarity of its release

Jahrestagung des SFB 593
09. – 12. Februar 2009, Hirschegg, Österreich

Die Vielfalt der Viren und ihre Erforschung

1. Marburger Stipendiaten-Symposium der Studienstiftung
31.10.2009, Marburg/Lahn

Posterpräsentationen

F. Lennartz, K. Dolata, and W. Garten

Mapping of the interaction domain between the Lassa virus protein nucleoprotein NP and the matrix protein Z
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie
14. – 17. März 2012, Essen

F. Lennartz, M. Lehmann, K. Dolata, and W. Garten

Trimerization of arenavirus nucleoprotein is mediated by two N-terminal coiled coil domains

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie

23. – 26. März 2011, Freiburg

K. Bayer, F. Lennartz, Y. Lu, G. Becker, T. Steinmetzer, K. Kehr, C. Herden and W. Garten

Importance of activated viral glycoprotein for spread of Borna disease virus in various cell cultures

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie

23. – 26. März 2011, Freiburg

F. Lennartz, K. Schlie, W. Garten

Expression, characterization and purification of the Lassa virus glycoprotein subunit GP2

International Symposium of the SFB 593

24.-25. September 2009, Marburg

F. Lennartz, K. Schlie, J. Dörrbecker, W. Garten

Purification of Lassa virus glycoprotein expressed in insect cells

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie

18. – 21. März 2009, Leipzig

F. Lennartz, K. Schlie, J. Dörrbecker, K. Dolata and W. Garten

Expression of the Lassa virus glycoprotein in insect cells

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie

05. – 08. März 2008, Heidelberg

Schlie K., F. Lennartz, F. Freiberg, P. Heinemann, U.Ströher, T. Strecker und W. Garten

Maturation cleavage correlates with trimerization of Lassa virus glycoprotein spikes

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie

05. – 08. März 2008, Heidelberg

Heinemann P., K. Schlie, F. Lennartz und W. Garten

The cytoplasmic and transmembrane domain are responsible for correct oligomerization of Lassa virus glycoprotein spikes

Third European Congress of Virology

01. – 05. September 2007, Nürnberg

Schlie K., P. Heinemann, F. Lennartz, T. Strecker und W. Garten

Impacts of the cytoplasmic domain on maturation of the Lassa virus glycoprotein GP
Third European Congress of Virology
01. – 05. September 2007, Nürnberg

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Frank Uwe Lennartz
Geburtsdatum	25.08.1982
Geburtsort	Essen
Wohnort	Alter Kirchhainer Weg 29, 35039 Marburg

Schul Ausbildung

1988 - 1992	Katholische Münsterschule in Essen
1992 - 2001	Burggymnasium Essen

Hochschulausbildung

Okt. 2002 – Sept. 2007	Studium der Biologie, Philipps-Universität Marburg Fächer : Virologie, Parasitologie, Genetik, Zusatzfach Zoologie
Sept. 2004	Vordiplom
Okt. 2006	Diplom-Prüfungen
Nov. 2006 – Sept. 2007	Diplomarbeit am Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg Thema: „Expression und Charakterisierung der Ektodomäne des Lassavirus-Glykoproteins in Insektenzellen“
Nov. 2007 – Jun. 2008:	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg

Untersuchungen zur Expression und Oligomerisierung des Lassavirus-Glykoproteins

Nov. 2007 – Feb. 2012

Doktorarbeit am Institut für Virologie

Thema : „Die Oligomerisierung des Nukleoproteins und
ihre Bedeutung für den Replikationszyklus der
Arenaviren

Stipendien und Förderprogramme

März 2005 – Sept. 2007

Studienstipendium der Studienstiftung des Deutschen
Volkes

Januar 2009 - Oktober 2010

Doktorandenstipendium der Studienstiftung des
Deutschen Volkes

November 2010

Projektbezogener Forschungszuschuss der Medizin-
Stiftung Marburg

Danksagung

Mein großer Dank gilt vor allem meinem Betreuer Prof. Dr. Wolfgang Garten, der es mir ermöglicht hat, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Seine Offenheit gegenüber diesem Thema, seine Motivation sowie die zahlreichen Diskussionen und Anregungen haben diese Arbeit entscheidend vorangebracht.

Prof. Dr. Klaus Lingelbach danke ich ganz herzlich für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie und die Bereitschaft, das Erstgutachten anzufertigen.

Prof. Dr. Erhard Bremer und Prof. Dr. Uwe Maier danke ich für ihre Bereitschaft, als Mitglieder der Prüfungskommission zu fungieren. Bei Ihnen und Prof. Dr. Klaus Lingelbach möchte ich mich auch stellvertretend für meine Kommilitoninnen und Kommilitonen dafür bedanken, dass Sie stets bereit sind, Arbeiten aus der Virologie am Fachbereich Biologie zu vertreten und zu prüfen.

Bei Prof. Dr. Stephan Becker bedanke ich mich für die guten Arbeitsbedingungen und das gute Arbeitsklima am Institut.

Prof. Dr. Stefan Günther und Maria Lehmann vom Hamburger Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin danke ich ganz herzlich für die Durchführung der Versuche mit dem Lassavirus-Replicon-System.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Thomas Hoenen für die Durchführung der Versuche zur Interferon-Inhibition und Dr. Allison Groseth für die Bereitstellung der Neuwelt-Arenavirus Nukleoprotein- und Matrixprotein-Konstrukte. Darüber hinaus möchte ich mich bei beiden ganz herzlich für zahlreiche anregende Diskussionen und ihre generelle Unterstützung bedanken.

Dr. Larissa Kolesnikova und Sonja Heck danke ich für die Hilfe bei der Probenvorbereitung für das Elektronenmikroskop und die schönen EM-Aufnahmen.

Bei meiner Nukleoprotein-Mitstreiterin Svenja möchte ich mich ganz herzlich für die Diskussionen um alles „Nukleoproteinige“ bedanken.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitgliedern des Instituts für Virologie danken. Die allseits vorhandene Bereitschaft zum Austausch von Material, Ideen und Motivation erzeugt eine hervorragende Arbeitsatmosphäre, in der das Arbeiten an einer Dissertation Spaß macht.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich herzlich für die finanzielle und ideelle Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit. Der Medizinstiftung Marburg danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Diese Arbeit wäre natürlich nicht ohne tatkräftige und vor allen Dingen nicht-wissenschaftsbezogene Hilfe vieler anderer Menschen möglich gewesen. Insbesondere bei Maria Lehmann, Sonja Gomez-Perez, Linda Pauksch, Karen Bayer und Juliane Dörrbecker möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir gezeigt haben, wie viel Spaß die Betreuung von Bachelor-, Master- und Diplomarbeiten machen kann. Ihnen und allen ehemaligen Praktikantinnen und Praktikanten danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Garten möchte ich ganz herzlich für die gute Atmosphäre sowie die Diskussionen, Anregungen und Unterstützung während meiner Doktorarbeit und natürlich die schönen AG-Ausflüge danken.

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an Ina, Boris, Caro und Claudia für zahlreiche Pausen, Tee-Runden, Mensa-Ausflüge, Koch-und-Grill-Abende, Schokoladenautomat-Exkursionen, Diskussionen und so vieles mehr, dass mir geholfen hat, auch einmal abzuschalten, wenn ein Versuch nicht funktioniert hat.

All meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mit stets willkommener Ablenkung vom Laboralltag dafür gesorgt haben, dass ich die Motivation nicht verliere und dafür, dass sie mich während von Beginn meines Studiums an bis hier begleitet haben. Ohne wundervolle Menschen wie euch wäre all dies nicht möglich gewesen.

Bei Sven und Irene, Ina und Jasmin möchte ich mich sehr, sehr herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und das Ausbügeln meiner Orthographie bedanken.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mich auf jedem Schritt stets unterstützt und ermutigt haben und es mir ermöglicht haben, den Weg bis hier zu gehen.

Zu guter Letzt wäre aber alles dies nicht möglich gewesen, ohne die stete Unterstützung, Zuneigung und Motivation nach so manch langem Tag und Wochenende im Labor. Dafür, dass du immer für mich da bist und mich unterstützt, meine ich ganz besonders dich, Jasmin, wenn ich sage:

Dankeschön.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Biologie Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

**„Die Oligomerisierung des Nukleoproteins und
ihre Bedeutung für den Replikationszyklus der Arenaviren“**

Im Institut für Virologie des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Garten ohne sonstige Hilfe durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)